UNIVERSITE DE LAUSANNE FACULTE DES SCIENCES
Ecole de pharmacie

Etude chimique de l'odeur de deux Gastéromycètes: Phallus impudicus L. et Anthurus archeri E. Fisch.

Thèse
présentée à l'Ecole de pharmacie de l'Université de Lausanne
pour l'obtention du grade de docteur ès sciences

par

PIERRE STUCKER
chimiste diplômé
de l'Université de Lausanne

1976

Clausthal-Zellerfeld
Bönecke-Druck

1979

UNIVERSITE DE LAUSANNE FACULTE DES SCIENCES
Ecole de pharmacie

Etude chimique de l'odeur de deux Gastéromycètes: Phallus impudicus L. et Anthurus archeri E. Fisch.

Thèse
présentée à l'Ecole de pharmacie de l'Université de Lausanne
pour l'obtention du grade de docteur ès sciences

par

PIERRE STUCKER
chimiste diplômé
de l'Université de Lausanne

Clausthal-Zellerfeld
Bönecke-Druck

1979

Imprimatur

Université de Lausanne
Faculté des Sciences

Vu le rapport présenté par le jury d'examen, composé de

MM les Professeurs A. Girardet, directeur de thèse, B. Testa, expert, et G. Brunisholz, président du jury

le Conseil de Faculté autorise l'impression de la thèse de

M. Pierre Stucker, chimiste diplômé de l'Université de Lausanne

intitulée "Etude chimique de l'odeur de deux Gastéromycètes : Phallus impudicus L. et Anthurus archeri E. Fisch"

Lausanne, le 23 juillet 1976

pour *Le doyen de la Faculté des Sciences :*
Georges Brunisholz, vice-doyen

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A mes parents

et à mon ami Robert Plattner

Le présent travail a été effectué d' octobre 197o à juin 1976 dans les laboratoires de chimie pharmaceutique de l' Ecole de pharmacie de l' Université de Lausanne, sous la direction de Monsieur le Professeur André Girardet.

J' aimerais exprimer ici à Monsieur le Professeur André Girardet ma profonde reconnaissance pour ses nombreux conseils et pour le soutien qu' il m' a prodigué tout au long de ce travail.

Mes remerciements vont également à Monsieur le Professeur Bernard Testa, qui a accepté de coexaminer ce travail et qui a su m' aider avec des remarques très pertinentes.

Ma pensée émue va à notre regretté chef préparateur René Regamey, qui m' a procuré une aide précieuse lors de la cueillette des champignons.

TABLE DES MATIERES

A. INTRODUCTION

I.	Botanique	p. 1
II.	Historique	p. 6
III.	Approche du problème	p. 8

B. RESULTATS ET DISCUSSION

I.	Classification et généralités	p. 11
II.	Flacon I: les amines	p. 13
III.	Flacon II: l' acide sulfhydrique	p. 31
IV.	Flacon III: les thiols	p. 36
V.	Flacon IV: les composés carbonylés	p. 45
VI.	Recherche d' autres composés	p. 62
	Discussion	p. 76
	Résumé	p. 81

C. PARTIE EXPERIMENTALE

I.	Généralités	p. 82
II.	Analyse des amines	p. 85
III.	Flacon II	p. 89
IV.	Analyse des thiols	p. 9o
V.	Analyse des substances carbonylées	p. 96
VI.	Analyse des autres substances	p. 1o1

D. BIBLIOGRAPHIE p. 1o5

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546820_0028

A. Introduction

I. BOTANIQUE.

Le présent travail a essentiellement pour objet l'étude de l'odeur de deux champignons appartenant à la classe des Basidiomycètes, sous-classe des Gastéromycètes: Phallus impudicus L. et Anthurus archeri E. Fisch. Au cours de ce travail, cependant, nous avons été amenés à nous intéresser également à l'odeur de deux autres représentants de cette sous-classe: Mutinus caninus Fr. et Clathrus ruber Mich.

Contrairement aux Hyménomycètes, chez lesquels l'hyménium est exposé à l'air avant maturation complète des spores par la croissance du carpophore, les Gastéromycètes sont caractérisés par un développement angiocarpe, c'est à dire que la partie fertile du champignon - ou glèba - est entourée par une enveloppe protectrice - le péridium - jusqu'à sa complète maturation.

La division actuelle des Gastéromycètes en une dizaine d'ordres repose avant tout sur les caractères morphologiques des carpophores, qui sont en relation étroite avec le mode de dispersion des spores.

Les champignons dont nous nous occupons ici se placent tous dans l'ordre des Phallales, caractérisé comme celui des Sautieriales par une forme très évoluée de carpophore: le clathrocèce. Très typique des Phallales est d'une part la présence fréquente d'un organe stérile, nommé réceptacle, dont la brusque expansion provoque la rupture du péridium et le transport de la glèba mûre à l'air libre, et d'autre part un péridium partiellement gélifié qui se retrouve, après rupture, comme une volve à la base du champignon.

Deux familles, les Clathracées et les Phallacées, vont nous intéresser spécialement dans cet ordre. Un représentant typique de la première famille est Clathrus ruber, le Clathre rouge, dont la glèba vert-noire est portée à l'intérieur d'un réceptacle rouge en forme de réseau, d'environ 5 - 10 cm de diamètre.

L'odeur des quelques exemplaires que nous avons pu examiner ressemblait, quoiqu'en beaucoup moins fort, à celle de Anthurus archeri (voir plus loin). En Europe, Clathrus ruber pousse dans les bosquets et forêts de feuillus des régions méditerranéenne et Ouest, au climat doux et océanique. Leur apparition est fortuite en Suisse.

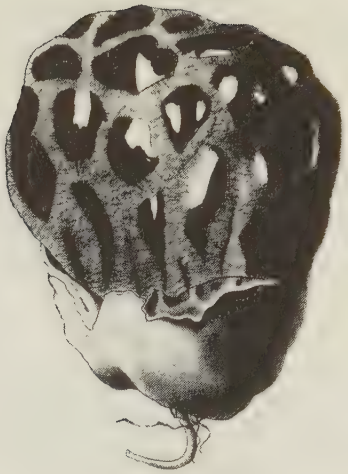


Fig. 1: Clathrus ruber.

Chez Anthurus archeri, ou Anthurus de l'archer, une autre Clathracée, la glèba vert-noire est portée par un réceptacle rouge en forme de sac prolongé par des bras, qui s'ouvrent en général en étoile après développement complet du champignon.

Ce Castéromycète d'origine australienne, à l'odeur fortement cadavérique, est d'apparition récente en Europe, puisqu'on l'a trouvé pour la première fois en 1920 sur l'emplacement d'un ancien camp d'entraînement américain, sur le versant Ouest des Vosges. Les militaires qui avaient occupé ce camp ayant d'abord transité par l'Australie, on peut penser que l'importation des spores s'est faite accidentellement sur leurs équipements.

Fig. 2: Anthurus archeri d. Fisch.

Une autre possibilité serait que celles-ci aient été importées sur des ballots de laine provenant d'Australie pour l'industrie lainière de Raon, à quelques kilomètres de là.

Quoi qu'il en soit, ce champignon s'est très vite adapté et étendu tant en direction de l'Est (Alsace, puis Allemangne jusqu'aux Préalpes bavaroises) qu'en direction du Sud, vers la Franche-Comté et la Bourgogne. Il semble qu'on en ait trouvé de rares exemplaires dans les cantons de Bâle et de Fribourg.

Il pousse en automne jusqu'au début de l'hiver sur le terrain herbeux des forêts claires et des gazons courts.

En passant à la famille des Phallacées, nous citerons d'abord Phallus impudicus, le phalle impudique, surnommé aussi le " satyre puant " ou encore"la morille puante" à cause de sa ressemblance extérieure avec la morille (Ascomycètes).

Fig. 3: la propagation d' Anthurus arch. en Europe.

Ce champignon spectaculaire voit sa glèba verte portée par un réceptacle comprenant deux parties soudées: l'une en forme de chapeau, munie de logettes, qui retient l'amas de spores lorsque la glèba devient déliquescente, l'autre en forme de stipe, qui élève l'ensemble à une hauteur de 15 - 30 cm environ.

Fig. 4: Phallus imp. I. et son "oeuf".

Phallus impudicus a une odeur fraîche et très fleurie lorsque le champignon vient à peine de s'ériger, mais celle-ci tourne rapidement à une odeur d'excréments caractéristique lorsque la glèba devient déliquescente et que le champignon vieillit. Ce dernier est répandu dans toute l'aire des forêts feuillues de la zone tempérée de l'hémisphère Nord, en Europe, Amérique du Nord et Asie orientale.

La seconde Phallacée qui nous intéresse est Mutinus caninus, ou Phallus des chiens, dont le réceptacle rougeâtre porte une glèba verte sans intermédiaire de chapeau. Plus petit de taille que Phallus impudicus (5 - 10 cm), son odeur est également beaucoup plus faible et plutôt doucereuse. On le trouve çà et là, surtout sur les vieilles souches, mais c'est en Suisse un champignon rare.

Remarquons encore que l'ancienne classification systématique tenait compte de la déliquescence de la glèba et de son " odeur fétide " pour définir l'ordre des Phallales; il n'est donc pas étonnant de trouver ces caractères communs à toutes nos espèces étudiées.

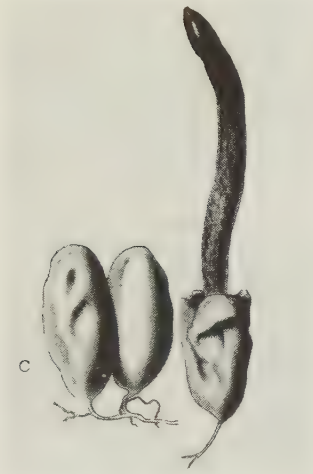


Fig. 5: Mutinus can. Fr.
et deux de ses "oeufs".

II. HISTORIQUE

Phallus impudicus est connu depuis fort longtemps. Son port spectaculaire semble avoir de tout temps frappé l'imagination des gens. Une preuve tangible de l'intérêt qu'il a suscité est qu'un auteur, J.C. Schäfer, lui consacre une monographie en 1760 déjà. Mais le Phallus est cité déjà bien avant cet ouvrage dans la littérature scientifique. B. Freund (1) en a publié une compilation exhaustive que nous ne reprendrons pas. Nous nous bornerons à survoler l'histoire de l'étonnant Gastéromycète.

Le nom de Phallus est déjà cité par Jonghe, en 1601, dans un ouvrage où il semble décrire non pas Phallus impudicus, mais son proche voisin, le Phallus des sables (ou des dunes): Phallus hadrianii Vent. per Pers.

Des préparations à base de Phallus impudicus semblent avoir été utilisées pendant très longtemps contre les rhumatismes et la goutte, comme en témoigne son ancien nom allemand de Gichtschwamm. Ses vertus aphrodisiaques étaient réputées, et bien qu'un auteur nie dès 1679 l'ancienne croyance selon laquelle le Phallus serait issu du sperme de cerf, on trouve encore cette assertion dans la littérature dite scientifique du 18e siècle.

Dans la première partie du 19e siècle, Krombholz, sur la foi d'essais personnels sur l'homme et les animaux, niera les effets pharmacologiques et plus spécialement les propriétés aphrodisiaques du champignon. Cependant, selon C. Reinhard (2), ces dernières le feraient encore utiliser de nos jours.

D'ailleurs, la curieuse Phallacée n'a pas fini de faire parler d'elle: en 1974, des auteurs russes (3) ont prétendu qu'une préparation à base de jus de Phallus permettait de guérir un certain nombre de tumeurs bénignes et même, rarement, des tumeurs malignes telles que le cancer de l'utérus. Quelle que soit la justesse de cette affirmation, elle montre bien que la Morille puante n'a pas fini d'étonner celui qui est amené à s'en approcher.

Les chimistes se sont également intéressés à ce remarquable Basidiomycète et en isolèrent, dès le début du 19e siècle, un certain nombre de sucres. Il faudra cependant attendre les

travaux de Klein et Steiner en 1928 pour que commence l'étude de son odeur. Ces auteurs (4) déterminent dans celle-ci la diméthylamine, la triméthylamine et l'isoamylamine. En 1953, grâce à une méthode plus précise de chromatographie sur papier, Steiner et Stein v. Kamienski (5) n'y trouvent plus que la triméthyl- et l'isoamylamine.

List et Reinhard (6), en 1961, sans cependant travailler sur l'odeur du Phallus, trouveront dans un extrait alcoolique de son " oeuf " (carpophore enfermé dans son péridium) la méthyl, l'éthyl et la β-phényléthylamine à côté d'un certain nombre de bases azotées. Enfin Wiegandt (7), en 1966, trouvera le phénylacétaldéhyde en même temps que List et Freund (1,8,9,10), lesquels ont entrepris une étude systématique de l'odeur du chapeau du champignon. Ils ont isolé par divers procédés (voir chapitre III) le formaldéhyde, l'acétaldéhyde, le phénylacétaldéhyde, l'α-phénylcrotonaldéhyde, la dihydrochalcone, les acides propionique, acétique et phénylacétique, de même que H_2S et le méthanethiol.

D'autres travaux sur Phallus impudicus, sans relation avec son odeur, sont cités par Freund (1).

De son côté, Anthurus archeri, malgré son odeur pénétrante, ne semble pas encore avoir beaucoup intéressé les chimistes. Le seul travail cité dans la littérature concerne sa couleur éclatante: il a été affectué par Egle (11) et porte sur un très petit échantillon. Selon cet auteur, le pigment principal est le lycopène, accompagné par un second, jaune citron et non identifié.

Du point de vue populaire, ce n'est sans doute que grâce à son apparition très récente chez nous que ce champignon frappant n'a pas encore suscité un nombre impressionant de légendes.

Chez Mutinus caninus et Clathrus ruber, ce même fait peut s'expliquer par leur relative rareté. De même, la littérature chimique ne parle pas de travaux ayant trait à ces deux Gastéromycètes.

III. APPROCHE DU PROBLEME.

Pour mener à bien cette étude, notre directeur de thèse cherchait une méthode qui éliminât de la façon la plus complète possible au moins trois sources d'erreur, soit:

a) employer une méthode d'extraction trop brutale (par exemple vapeur d'eau à 95 °C) qui pourrait provoquer la décomposition de certains constituants volatils,
b) hydrolyser par une méthode artificielle certains composés naturels en provoquant la formation d'artéfacts: amines à partir d'amides, triméthylamine à partir de bétaïnes, etc.,
c) tuer le champignon rapidement, par exemple par immersion dans un solvant organique ou dans l'eau bouillante, opération qui ne permet d'en obtenir que les seules substances présentes à cet instant précis, mais pas celles qui avaient été dégagées auparavant, ni celles qui le seraient jusqu'à la mort naturelle du champignon.

Or, il apparaissait qu'aucune des méthodes utilisées par List et Freund dès 1966 n'éliminait complètement ces trois inconvénients. En effet, ces auteurs ont isolé:

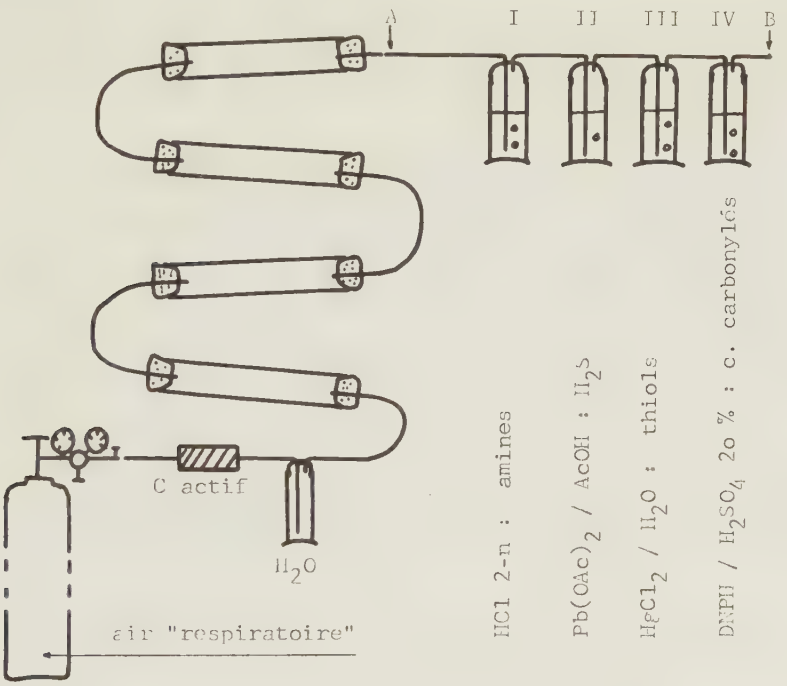
1) les aldéhydes volatils dans les condensats d'une lyophilisation de 7.5 kg de chapeaux de Phallus,
2) la dihydrochalcone et les acides dans un extrait à l'éther de 8 kg de chapeaux,
3) H_2S et le méthanethiol dans la solution de KOH qui servait de trappe finale à un système de distillation à la vapeur parcouru par un courant d'azote et contenant 2.2 kg de chapeaux.

Si la troisième méthode frappe particulièrement par sa brutalité, toutes trois impliquent une mort rapide du champignon, entraînant, mis à part la forte perte de rendement de substances odorantes, le risque de ne pouvoir déceler des substances non encore présentes ou déjà disparues au moment de cette mort.

Les premiers essais effectués sporadiquement avec le concours de Mme Doris Meylan pendant les étés 1968 et 1969 avec un nombre très restreint de Phallus permirent de préciser les conditions physiques élémentaires permettant de maintenir en en vie pendant plusieurs jours des champignons parfaitement développés et de fixer pendant ce laps de temps la totalité des gaz odorants émis. Ces essais devaient aboutir à la mise

au point d'un procédé d'enfleurage, dans lequel les champignons sont placés dans une enceinte traversée par un faible courant d'air humidifié. Entraînée par l'air, l'odeur était ensuite retenue dans les solutions absorbantes appropriées, le système de captage définitif étant celui de la figure 6.

Figure 6.



L'air (qualité respiratoire) passe d'abord dans un tube rempli de charbon actif, puis dans un flacon laveur contenant de l'eau, où il est légèrement humidifié. Après passage dans les tubes qui contiennent les champignons, l'air chargé des odeurs passe d'abord dans un flacon laveur contenant de l'acide chlorhydrique dilué, qui fixe assez sélectivement les amines.

Le H_2S éventuellement présent dans l'odeur sera absorbé dans le flacon suivant, contenant de l'acétate de plomb en milieu acide acétique, alors que les thiols seront retenus sous forme d'un

complexe insoluble dans le troisième flacon, contenant une solution de chlorure mercurique. Les composés carbonylés sont captés en dernier lieu, et précipités sous la forme de leur dinitrophénylhydrazones dans le flacon IV. L'efficacité de ce système est suggérée par le fait que le courant d'air, très odorant en A, ne présente plus aucune odeur perceptible en I.

On fera, de plus, une chromatographie en phase gazeuse de l'odeur de chaque échantillon selon la technique de la " head space analysis". Les résultats obtenus par cette méthode, qui respecte au maximum les conditions naturelles, pourront être comparés par la suite à ceux obtenus par l'analyse chimique.

Mais au départ, le Phallus impudicus devait encore nous poser un problème. Nous désirions nous faire une idée de l'odeur du champignon dans son ensemble, telle qu'on peut la sentir en ayant un exemplaire en main. Cependant, la littérature regorge de contradictions quant à la provenance de cette odeur. Beaucoup d'auteurs, parmi lesquels les tenants de l'ancienne taxonomie, voient son siège dans la plèba déliquescente, alors que d'autres le situent dans le stipe. List, dans un article de 1968 (13) se range dans les premiers alors que Clémençon (14), après avoir présenté d'une manière très complète les deux opinions à travers la littérature, se range, sur la foi d'un essai personnel, du côté des seconds.

Afin de mettre à l'épreuve les deux hypothèses, nous avons séparé pieds et chapeaux et étudié leur odeur parallèlement. Plus tard cette idée sera encore poursuivie lorsque nous séparerons les deux parties du chapeau: sa plèba verte et sa carcasse alvéolée, qui est une partie du réceptacle.

Quant aux autres champignons, du fait de la difficulté de séparer proprement la plèba du réceptacle, ils ont été étudiés dans leur ensemble. Cette manière de faire est d'ailleurs celle qui est la plus fidèle à notre perception olfactive. Dans tous les cas, le péridium déchiré en forme de volve, ne présentant pas d'odeur particulière, a été jeté.

B. Résultats et discussion

I. CLASSIFICATION ET GENERALITES.

Pour la présentation des résultats, nous respecterons l'ordre même du schéma précédent, et le contenu du premier flacon sera donc examiné pour commencer. Le tableau ci-dessous montre comment nous avons procédé à la numérotation des échantillons.

ESPECE \ FLACON		1	2	3	4
Phallus imp.	A	A_1	A_2	A_3	A_4
Anthurus arch.	B	B_1	B_2	B_3	B_4
Mutinus can.	C	C_1	C_2	C_3	C_4
Clathrus rub.	D	D_1	D_2	D_3	D_4

Exemple: A_1 est un quelconque échantillon d'amines·HCl de Phallus.
A_{11} et A_{12} etc sont des échantillons spécifiques d'amines·HCl de Phallus.

Après l'examen des quatre flacons, nous citerons les résultats obtenus dans la recherche d'autres substances dans nos champignons, ainsi que diverses autres considérations. Dans chaque cas la méthode analytique sera discutée, puis suivie par une présentation des essais à blanc et de l'analyse des échantillons.

La chromatographie en phase gazeuse.

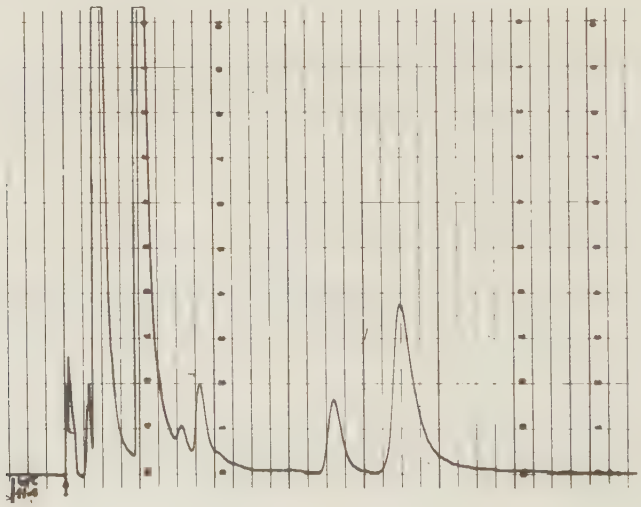
Nous avons travaillé en GC principalement selon deux techniques différentes, en utilisant généralement une colonne de verre de 7' par 2mm de diamètre intérieur, chargée de silicone SE 30 à 15 % sur du Chromosorb G AW:

a) "head space analysis" de l'odeur totale à un moment donné du champignon vivant.
b) "head space analysis" d'une fraction de son odeur, après son extraction préalable. Par exemple, le contenu du flacon I est alcalinisé et les amines libérées analysées dans la phase vapeur.

Dans les deux cas, nous avons procédé à des injections de 5ml de phase vapeur, la température du four étant fixée à 40, 50, ou 80 °C et le débit de gaz vecteur à 20ml/min.

On remarquera immédiatement que la technique a) est beaucoup moins spécifique que la seconde, deux composés appartenant à des groupes chimiques très différents pouvant posséder le même temps de rétention. Ceci est d'autant plus vrai ici, car, ne disposant pas de colonnes capillaires, nous avons dû nous contenter de colonnes de 7 pieds, dont la résolution n'est pas comparable. Le chromatogramme suivant (fig 7), résultat de l'analyse de l'odeur d'une partie du Phallus selon la technique a) illustre bien ce fait: plusieurs pics sont superposés et mal résolus. Comme nous le verrons dès le paragraphe suivant, la GC utilisée selon la technique b) donne des résultats beaucoup plus clairs et plus parlants. Cependant, la première manière de procéder, outre qu'elle a apporté parfois une preuve très utile à l'analyse chimique, nous a permis également de nous faire une première idée avant d'attaquer cette analyse.

Fig. 7: GC de l' odeur de la tige de Phallus selon la tech. a)



La chromatographie en phase gazeuse a encore été utilisée selon une méthode plus courante pour résoudre certains problèmes spécifiques, comme nous le verrons plus loin (partie VI).

II. FLACON I : LES AMINES.

II. 1. Méthode analytique.

Les amines parmi lesquelles nous classerons l'ammoniac, sont fixées par l'acide chlorhydrique dilué du premier flacon sous forme de leurs chlorures d'ammonium (chlorhydrates d'amines):

Plusieurs auteurs dont Steiner et Stein von Kamienski (5) ou List et Reinhard (2)ont utilisé directement ces chlorures pour l'identification des amines. La chromatographie sur papier de ces dérivés a été décrite, de même que, plus récemment (15), leur chromatographie sur couche mince (ccm). Solubles dans l'eau lourde, ils doivent particulièrement bien convenir à la spectroscopie de rmn, aucun reste organique étranger ne pouvant interférer.

Dès les premières tentatives de séparer nos échantillons par ccm, nous devions cependant voir surgir un certain nombre de problèmes, entre autres celui de la révélation des chlorures d'ammonium et de triméthylammonium par les révélateurs cités dans la littérature. De plus, la séparation ne semblant pas excellente, la ccm préparative s'annonçait difficile, et nous avons dès lors envisagé l'utilisation d'une deuxième série de dérivés valables pour les amines I et II, les 3,5-dinitrobenzamides (DNBA), dont la séparation par ccm est citée par Stahl (15). Ces amides, obtenues par l'action du chlorure de 3,5-dinitrobenzoyle sur les chlorures d'ammonium en milieu alcalin, se

prêtent remarquablement bien à la ccm, cristallisent bien et possèdent des points de fusion nets (cf tableau 1).

Tabl. 1. Les 3,5-dinitrobenzamides.

amine	cristaux	F
ammoniac	fines aig. jaunâtres	165-167 °C
méthylamine	feuilles jaunâtres	150-151 °C
diméthylamine	fines aig. jaunâtres	127-129 °C
éthylamine	aiguilles jaunâtres	124-127 °C
β-φ-éthylamine	courtes aig. fines	147-150 °C
isopropylamine	fines aig. jaunâtres	136-137 °C

Le mélange résultant de la réaction ci-dessus, une fois débarrassé de la phase éthérée contenant le dérivé formé, renferme encore la totalité des amines tertiaires et la partie des amines I et II qui n'a pas réagi. Il est alors soumis à une distillation sur KOH et le distillat reccueilli dans l'acide chlorhydrique dilué. Dans le schéma de la fig 8, nous appelons E l'échantillon de chlorures d'ammonium de départ et E' les chlorures obtenus par l'opération ci-dessus. E et E' peuvent être analysés par GC selon la méthode b) (page 11)

Dans certains cas où une incertitude subsistait après l'analyse des DNBA, nous avons eu recours à un troisième type de dérivés: les 2,4-dinitroanilines N-substituées (DNA). En milieu alcalin, le 2,4-dinitrofluorobenzène réagit avec les chlorhydrates des amines I et II pour former, avec un bon rendement, des composés cristallisant bien et ayant des points de fusion nets (tableau 2).

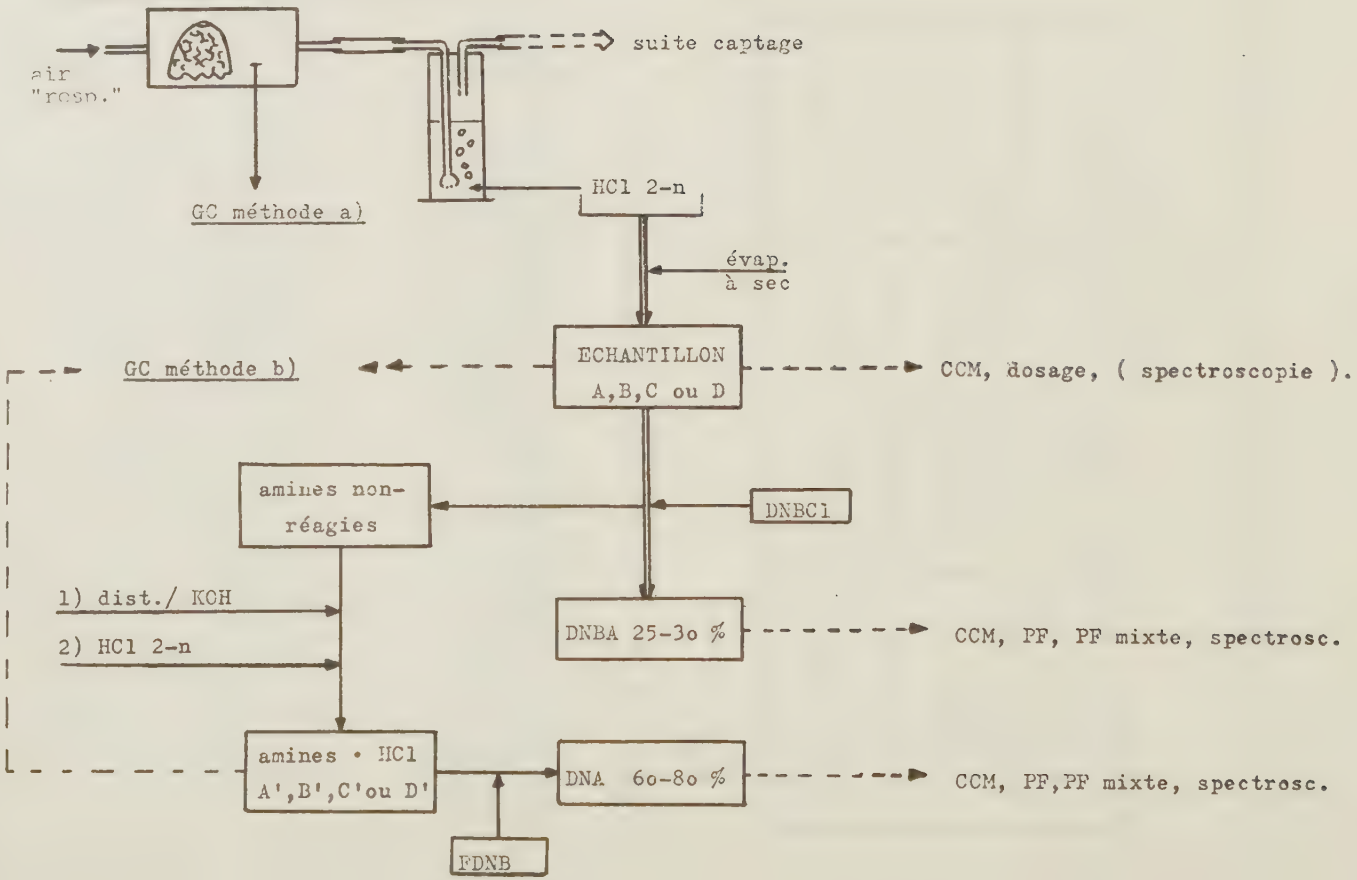
Tabl. 2. Les 2,4-dinitroanilines

amine	cristaux	PF
ammoniac	aig. jaune intense	177-179 °C
méthylamine	aiguilles jaunes	179-182 °C
diméthylamine	longues aig. jaunes	75- 77 °C
éthylamine	compacts, orangés	97-103 °C
β-γ-éthylamine	aiguilles jaunes	156 °C

Schwartz et al, cités par Stahl (15), en ont décrit la séparation par ccm.

La dernière réaction décrite peut s'appliquer aussi bien à E qu'à E', et nous obtenons ainsi le schéma analytique définitif de nos amines (figure 8). Rappelons toutefois que les dérivés du type DNA n'ont été utilisés que dans les cas incertains.

Figure 8. Schéma analytique des amines.



II. 2. L'essai à blanc.

L'efficacité des dérivés DNBA et DNA pour l'analyse des amines I et II devait encore être éprouvée, et dans ce but nous avons préparé l'échantillon témoin suivant, qui est un mélange des chlorhydrates des amines I et II isolées dans Phallus imp. par les divers auteurs que nous avons cités:

E: 97 % NH_4Cl
1,3 % $MeNH_3Cl$
0,4 % $EtNH_3Cl$
0,6 % β-$EtNH_3Cl$
0,7 % Me_2NH_2Cl

La proportion relative des divers composants, surprenante à première vue, s'explique ainsi: nous avions commencé, avant d'effectuer cet essai à blanc, l'analyse de l'échantillon A_1 (cf. II. 3.1.1.) et avions constaté l'énorme quantité de NH_3 par rapport aux amines I et II dans l'odeur de la tige de Phallus. Il fallait donc vérifier si sa présence en grande quantité ne pouvait pas masquer celle, beaucoup plus discrète, d'une autre amine.

La transformation de 500 mg de E en DNBA donne 542 mg de dérivé brut qui est immédiatement soumis à des ccm avec deux phases mobiles différentes (fig. 9). Les témoins (T) utilisés sont des dinitrobenzamides fraîchement synthétisées et recristallisées.

On constate que toutes les taches sont nettement visibles. La limite de détection est inférieure à 0,1 γg et nous pouvons constater la présence ou l'absence de moins de 1 % d'amines dans du NH_3.

Une recristallisation dans l'éthanol dilué du dérivé E-DNBA ne suffit pas à éliminer complètement les amides présentes en petite quantité: un premier phénomène de fusion à 160 °C n'est suivi de la fusion proprement dite que entre 182 et 185 °C.

Fig. 9: ccm de E -DNBA.

Phase stat: GF_{254}, 0.25 mm
Phase mob: 1 et 2
Front: 16.5 cm
Temp: ambiante
T: DNBA de
1) β-phényléthylamine
2) isoamylamine
3) diméthylamine
4) éthylamine
5) méthylamine
6) ammoniac

Dépôts: 1 µl en sol. de $CHCl_3$ (1%).

En suivant notre schéma analytique, le mélange réactionel de la première opération est alors soumis à une distillation sur KOH, avec condensation dans HCl dilué. L'évaporation de l'acide chlorhydrique à sec nous donnera E', que nous transformons en dérivé E'-DNA au moyen du FDNB. On obtient 1030 mg de dérivé brut que l'on soumet également à une ccm.

Bien que notre séparation des dérivés DNA en ccm soit moins bonne que celle des dinitrobenzamides, nous voyons cependant sur la figure 10 que les dérivés des dernières, malgré leur faible teneur, sont nettement visibles à côté de celui de l'ammoniac. Ajouté aux autres, ce fait illustre bien la sensibilité, et par là la validité de notre schéma analytique.

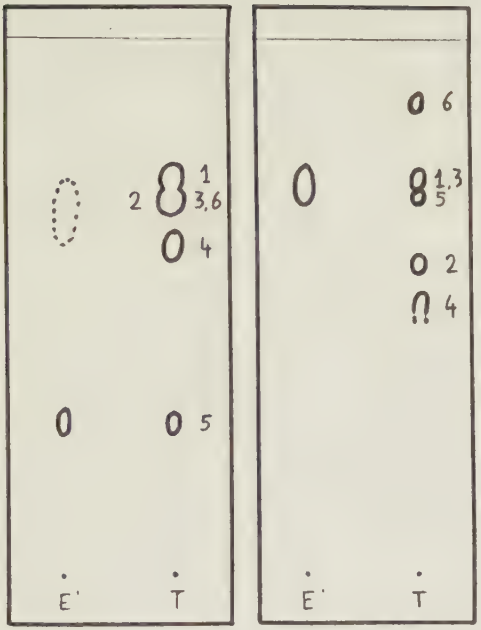


Fig. 1o: ccm de E'-DNA.

Phase stat: GF_{254}, o.25 mm
Phase mob: 1 et 3
Front: 15 et 1o cm
Temp: ordinaire
T: DNA de
1) β-phényléthylamine
2) diméthylamine
3) éthylamine
4) méthylamine
5) ammoniac
6) FDNB

Dépôts: 1 µl de sol. à 1% ds $CHCl_3$.

II. 3. Analyse des échantillons.

II. 3. 1. Phallus impudicus.

Nous distinguerons dans ce champignon les échantillons de chlorhydrates provenant de l'odeur du stipe (A_{11} et A_{12}) et ceux provenant de l'odeur du chapeau: A_{13} et A_{14}.

II. 3. 1. 1. A_{11}: amines 'HCl de 81 tiges de Phallus.

L'évaporation à sec de l'acide chlorhydrique dilué laisse un résidu blanc grisâtre, non déliquescent, dont le poids est de 1830 mg. En ccm, nous obtenons le résultat de la fig 11.

Fig 11: ccm de A_{11} et B_{11}.

Phase stat: GF, o.25 mm
Phases mob:
a) phénol/eau (8o+3o)
b) phase sup. du mélange
n-butane/AcOH/H_2O (4o+1o+5o)
Temp: ordinaire
T: amines.HCl de
1) diméthylamine
2) éthylamine
3) méthylamine
4) ammoniac
Dépôts: 1 µl sol. aq. 1%
Révélateurs: vanilline,
ninhydrine,
iode.

On remarque en particulier que la visualisation des amines. HCl de bas poids moléculaire est très médiocre et que la triméthylamine n'est même pas révélée. Nous ne pouvons donc tirer beaucoup de conclusions de ces ccm, sinon que NH_4Cl semble être présent, puisque non visualisé, de même peut-être que d'autres amines, en faible quantité.

Nous transformons donc 500 mg de A_{11} en A_{11}-DNBA, pour obtenir 504 mg de dérivé brut, que nous soumettons, parallèlement aux témoins purs, à une série de trois ccm (fig. 12).

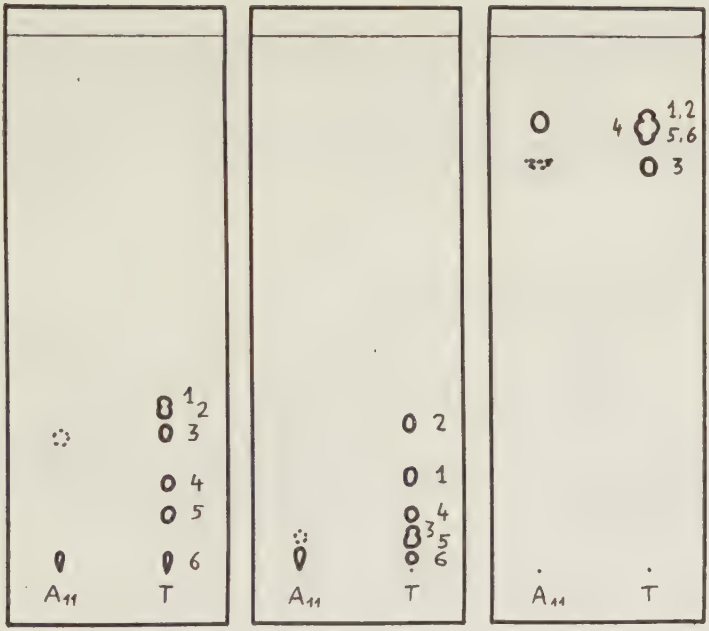
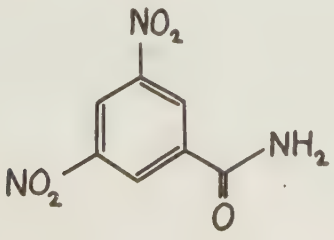


Fig. 12: ccm de A_{11}-DNBA.

Toutes les conditions exp, de même que les témoins utilisés, sont identiques à ceux de la fig. 9, p. 18. La 3e ccm a été développée avec la phase mobile 3.

On remarque que le dérivé de l'ammoniac domine nettement, accompagné seulement d'un peu de diméthylamine-DNBA. Une estimation de sa quantité par comparaison entre l'intensité de sa tache à celles du témoin à diverses concentrations montre que le dérivé de la diméthylamine ne représente qu'environ la millième partie du mélange. Cette constatation nous a amené à ne pas tenter d'isoler cette substance. Elle nous a montré, de plus, qu'une ccm préparative n'était pas nécessaire pour isoler la substance prédominante. En effet, une simple recristallisation dans l'éthanol dilué de A_{11}-DNBA nous fournit des cristaux en aiguilles jaunâtres dont le point de fusion est de 184-187 °C. Un point de fusion mixte avec la dinitrobenzamide de synthèse n'a pas donné de dépression et la comparaison des spectres IR des deux substances montre de manière définitive que le produit isolé est bien



Selon notre schéma analytique, nous avons ensuite distillé sur KOH le mélange réactionnel de la sythèse des DNBA et recueilli les amines dans l'acide chlorhydrique dilué. L'évaporation à sec de l'acide nous a donné A'_{11}, que nous avons transformé en A'_{11}-DNA pour obtenir 1050 mg de dérivé brut. Sa séparation par ccm (fig 13) nous montre la parfaite corrélation entre les résultats obtenus par l'étude des deux dérivés DNA et DNBA.

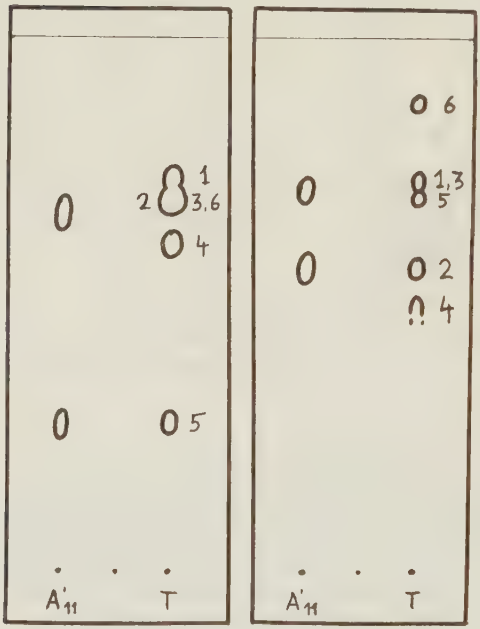


Fig. 13: ccm de A'_{11}-DNA.

Toutes les conditions expérimentales, de même que les témoins utilisés, sont identiques à ceux de la figure 1o, page 19.

Recherche des amines tertiaires.

Elle est nécessitée par le fait qu'elle ne réagissent ni avec le chlorure de dinitrobenzoyle, ni avec le fluorodinitrobenzène. De plus, nous avions vu que la triméthyamine n'était pas révélée en ccm. (fig 11).

L'étude de A_{11} en GC selon la méthode b) nous donne le résultat suivant, tiré entre autres du chromatogramme de la fig 14: on remarque nettement la présence de la triméthylamine à côté de l'ammoniac et de la diméthylamine.

A ce stade, il devenait intéressant d'évaluer le rapport NH_4Cl/ Me_3NHCl dans l'échantillon A_{11}.

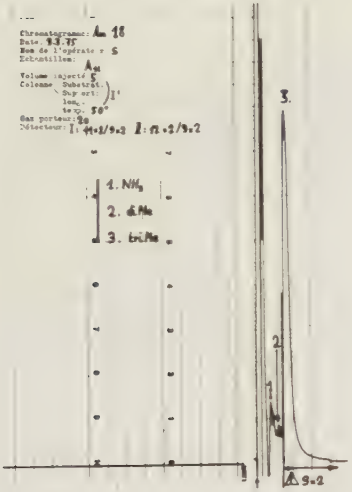


Fig. 14: GC de A_{11}.

La chromatographie en phase gazeuse ne pouvant ici nous aider de manière efficace, il a donc été décidé de faire le dosage du chlorure dans A_{11}, en tenant la quantité de Me_2NH_2Cl pour négligeable, ce qui semble correct si on tient compte simultanément de sa faible teneur et de l'imprécision sur la mesure. Le dosage a été effectué selon Mohr, sur des solutions environ 0,01-n. La teneur en Cl^- de A_{11} (64.24 %) a été comparée à celle d'un échantillon de NH_4Cl pur, soit 66.28 %. Le calcul nous donne une teneur de 7 % en Me_3NHCl et 93 % en NH_4Cl.

II. 3. 1. 2. A_{12}: amines·HCl de 62 vieilles tiges de Phallus.

Nous appellerons "vieilles" des tiges qui perdent leur turgescence et commencent visiblement à perdre de l'eau, ce qui se produit parfois dès le 4e jour, parfois à partir du 5e ou 6e seulement (voir partie expérimentale).

L'évaporation à sec de l'acide chlorhydrique nous donne 190 mg de chlorhydrates. A part le dosage du chlorure, qui n'a pas été effectué, l'analyse selon le procédé ci-dessus a donné le même résultat que pour A_{11}.

II. 3. 1. 3. A_{13}: amines · HCl de chapeaux de Phallus.

L'évaporation du HCl fournit un résidu A_{13} de 30.8 mg seulement, dont on fait la ccm. La seule tache qui ne peut être considérée comme certaine est celle correspondant à NH_4Cl (toujours mal révélé.)L'échantillon a alors été soumis à la synthèse du deuxième dérivé, qui a conduit à l'obtention de 19,2 mg de dinitrobenzamides, dont les ccm avec les trois phases mobiles donnent le résultat suivant (fig 15)

- NH_3-DNBA est de nouveau prépondérant,
- on distingue nettement de faibles taches pouvant correspondre, d'après leur hRf dans les trois ccm, aux méthyl, diméthyl et β- phényléthylamine-DNBA. Leur quantité, estimée à 1 o/oo de celle de la NH_3-DNBA, était trop faible pour que nous songions à isoler ces substances.

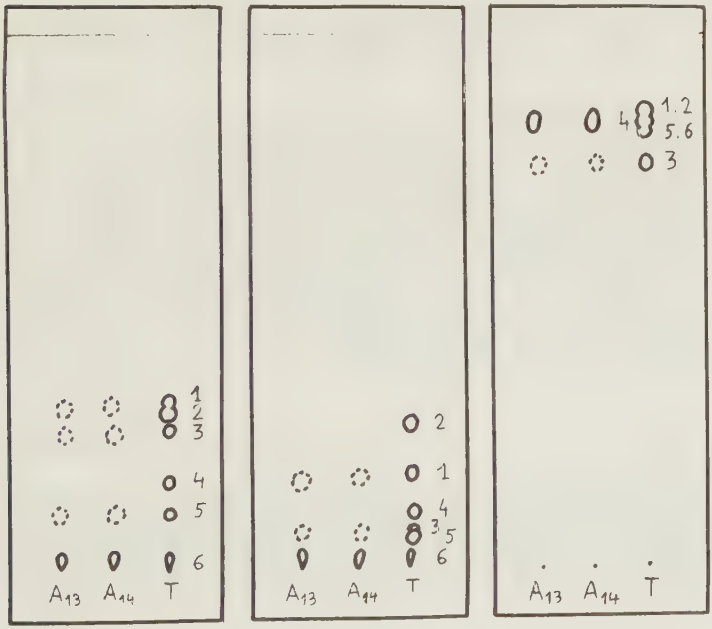
La recristallisation de A_{13}-DNBA dans l'éthanol dilué a permis d'obtenir des cristaux jaunâtres de PF=186 °C et dont le PF mixte avec la 3,5-dinitrobenzamide de synthèse ne donne pas de dépression. La correspondance entre les spectres IR des deux substances, également parfaite, nous assure que le composé isolé est bien identique à la 3,5-dinitrobenzamide.

Les amines non réagies dans la sythèse des DNBA sont récupérées selon le schéma de la fig 8, ce qui nous permet d'obtenir A_{13}. On cherche dans cet échantillon la triméthylamine par GC selon la méthode b). Bien que son pic soit nettement présent, il l'est cependant dans une proportion bien moins grande par rapport à NH_3 que dans la tige. Les faibles quantités de chlor-

hydrates obtenues dans ce captage n'ont pas permis de faire simultanément l'analyse qualitative de l'échantillon et le dosage permettant d'évaluer le rapport NH_3/Me_3N.

Fig. 15: ccm de A_{13}- et A_{14}-DNBA.

Les conditions expérimentales et témoins utilisés sont les mêmes que dans la figure 9, page 18.



II. 3. 1. 4. A_{14} : amines 'HCl de l'odeur de 25 chapeaux de Phallus.

A_{14} ne pèse, après évaporation à sec de l'acide, que 9 mg, et les 2 mg de A_{14}-DNBA brut qu'il a permis d'obtenir ont servi à vérifier l'analyse de A_{13}. Comme on le voit sur la ccm fig. 15, les résultats correspondent exactement à ceux de cette première analyse.

II. 3. 2. Anthurus archeri.

B_{11} : amines 'HCl de 71 Anthurus.

L'évaporation de l'acide chlorhydrique nous donne un résidu non déliquescent de 1390.6 mg. Soumis à la ccm, B_{11} montre exactement le même comportement que A_{11} (fig 11).

On transforme alors 500 mg de B_{11} en dérivé DNBA (610 mg). Les ccm de ce dérivé nous indiquent la présence en majeure partie de la NH_3-DNBA, alors que la diméthylamine-DNBA n'est présente qu'en quantité beaucoup plus faible. Là encore, ce résultat rappelle celui obtenu pour A_{11}, et nous recristallisons de même B_{11}-DNBA pour obtenir des cristaux jaunâtres dont le point de fusion est de 185-186 °C. Le point de fusion mixte avec la 3,5-dinitrobenzamide de synthèse ne donnant pas de dépression et les spectres IR des deux substances correspondant exactement, nous pouvons conclure à l'identité du composé isolé avec celui de référence.

Recherche de la triméthylamine.

Par une chromatographie en phase gazeuse du matériel vivant selon la méthode a), nous avions déjà pu montrer la possibilité de la présence de di- et triméthylamine, ce que la GC selon la méthode b) de l'échantillon B_{11} (fig 16) devait permettre de vérifier.

Fig. 16: GC de B_{11}.

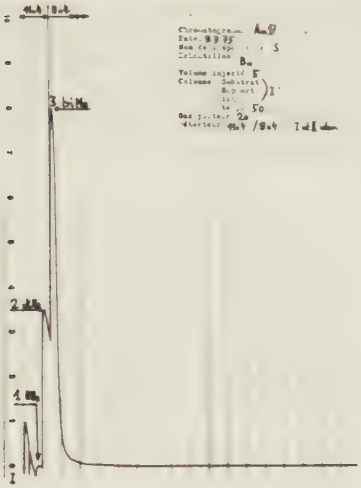
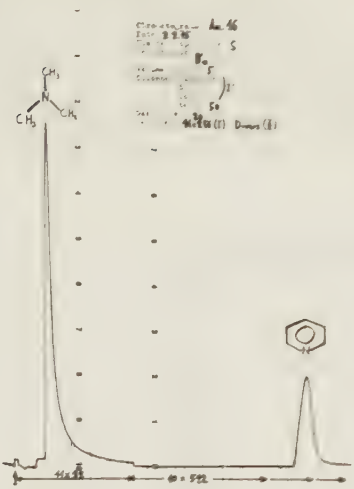


Fig. 17: GC de B'_{11}.



Pour confirmer encore la présence de la triméthylamine, nous avons récupéré les amines non réagies dans la synthèse de la B_{11}-DNBA pour obtenir B'_{11} selon le schéma analytique de la fig 8. Chromatographié en GC selon la technique b,, ce résidu contient effectivement la triméthylamine, comme le confirment les chromatogrammes de la fig 17, où nous la retrouvons à côté de la pyridine qui sert de catalyseur lors de la synthèse des DNBA et qui est évidemment aussi entraînée par la distillation qui sert à récupérer les amines non réagies.

Rapport NH_4Cl / Me_3NHCl dans B_{11}.

En tenant le même raisonnement que pour A_{11} (cf II.3.1.1.), nous avons dosé le chlorure dans l'échantillon B_{11} pour trouver 64,44 % de Cl^- contre 66,20 % Cl^- dans NH_4Cl pur. Le calcul nous donne ici: 6 % de Me_3NHCl et 94 % de NH_4Cl environ.

II. 3. 3. Mutinus caninus.

Nous n'avons pu obtenir de ce Gastéromycète que sept exemplaires au cours de l'été 1973. L'échantillon C_{11}, obtenu par évaporation à sec de l'acide chlorhydrique dilué, est constitué par un résidu pratiquement blanc, non déliquescent, de 37,3 mg de chlorhydrates. Sa transformation en C_{11}-DNBA nous a donné 58.0 mg de dérivé que nous avons immédiatement soumis à trois ccm avec trois phases mobiles différentes (fig 18)

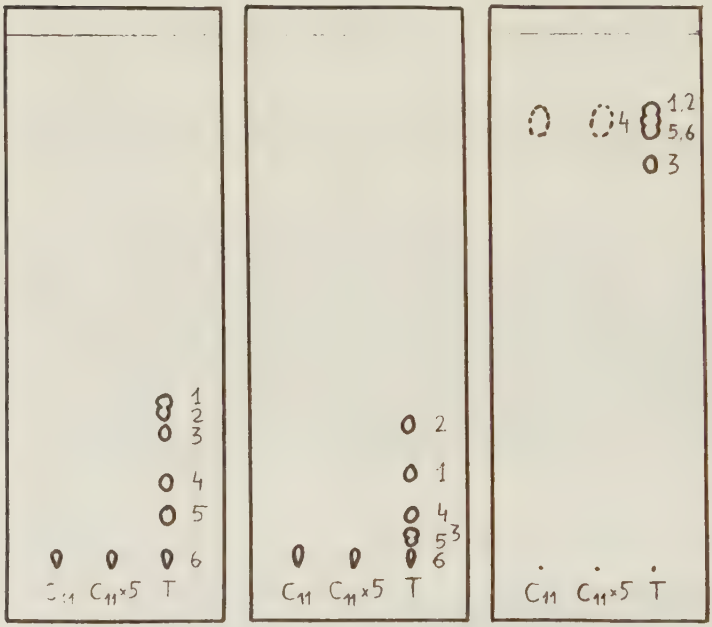


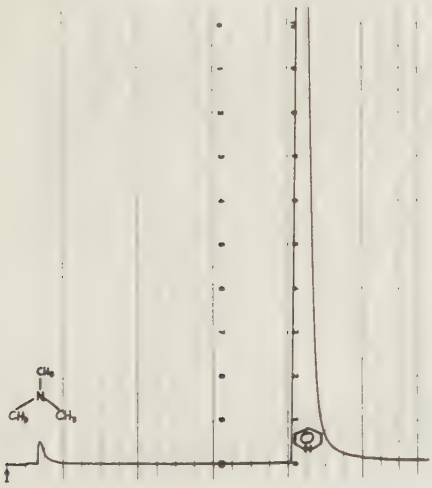
Fig. 18: ccm de C_{11}-DNBA.

Les conditions expérimentales et témoins utilisés sont les mêmes que dans les figures 9, page 18 et 12, page 21.

Une seule tache se retrouve sur ces chromatographies, même si on augmente le dépôt initial de C_{11}-DNBA: celle de la 3,5-dinitrobenzamide elle-même. Une récristallisation du dérivé a été faite, ce qui nous a permis de l'obtenir pur et de l'identifier sans équivoque grâce à son point de fusion de 185-187 °C, son point de fusion mixte sans dépression avec la 3,5-dinitrobenzamide de synthèse et la comparaison de l'empreinte de spectre IR des deux substances. Le composé isolé est donc bien identique à celui de référence.

Les amines non réagies dans la sythèse du dérivé ont été récupérées conformément au schéma analytique et le résidu C'_{11} obtenu analysé par GC après alcalinisation (fig 19)

Fig. 19: GC de C'_{11}.



On remarque aisément, sur ce chromatogramme, le pic de la triméthylamine à côté de celui de la pyridine provenant du mélange réactionnel des DMBA.

Ces résultats confirment en fait l'analyse GC faite sur le matériel vivant selon la méthode a) laquelle n'avait donné aucun signal possible pour la diméthylamine, contrairement aux cas de Phallus imp. et Anthurus arch.

II. 3. 4. Clathrus ruber.

Le matériel dont nous disposions consistait en quatre jeunes (encore enveloppés dans leur péridium) et deux "vieux" (sortis du péridium) Clathrus ruber parvenus de Grèce et a été divisé en deux parties suivant l'âge des champignons. Vu le petit nombre d'échantillons, nous n'avons pas procédé ici selon le schéma habituel; l' étude s'est limitée à l'analyse par GC selon la méthode b) des résidus des chlorhydrates.

II. 3. 4. 1. D_{11}: 11 mg d'amines·HCl de l'odeur de 4 Clathrus.

Une chromatographie en phase gazeuse selon la méthode b) du résidu alcalinisé nous indique très nettement (cf fig 2o): NH_3, la triméthylamine et un troisième pic pouvant correspondre à une propyl- ou une butylamine. La comparaison avec des substances de référence a montré que son temps de rétention correspond exactement à celui de la n-propylamine.

II. 3. 4. 2. D_{12}: 4 mg d'amines·HCl de l'odeur de 2 Clathrus.

L'analyse a été conduite exactement de la même manière. Le résultat est analogue et le signal pouvant correspondre à la n-propylamine toujours présent.

Sans que ces résultats constituent une preuve formelle de la présence de la n-propylamine dans Clathrus ruber, celle-ci peut cependant être considérée comme probable. Nous n'avons malheureusement pas pu disposer jusqu'alors d'un matériel plus abondant qui nous aurait permis de confirmer l'occurence de cette amine par la méthode des dérivés.

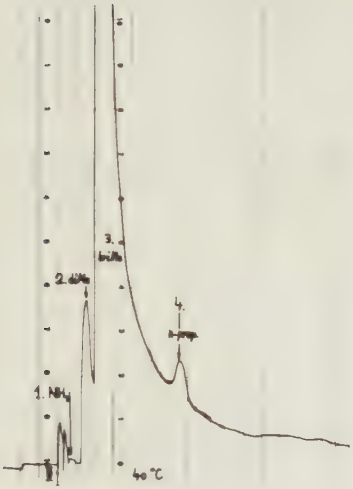
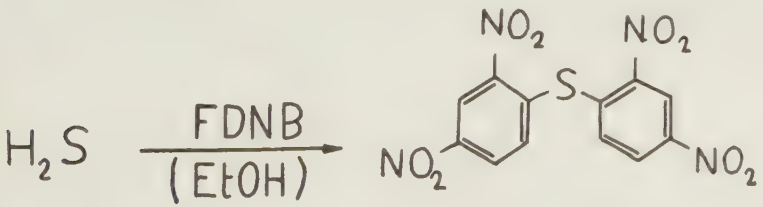


Fig. 2o: GC des amines de Clathrus ruber.

III. FLACON II. L'ACIDE SULFHYDRIQUE.

III. 1. Méthode analytique.

La "fort désagréable" odeur de nos champignons fait penser automatiquement à la présence possible de ce composé sou r[illegible]. Freund (1) devait d'ailleurs l'isoler de l'hallus imp. sous forme de dérivé 2,4-dinitrophénylthioéther:



Procédant différemment, nous désirions le capter dans le flacon II où il devait précipiter sous forme de sulfure de plomb:

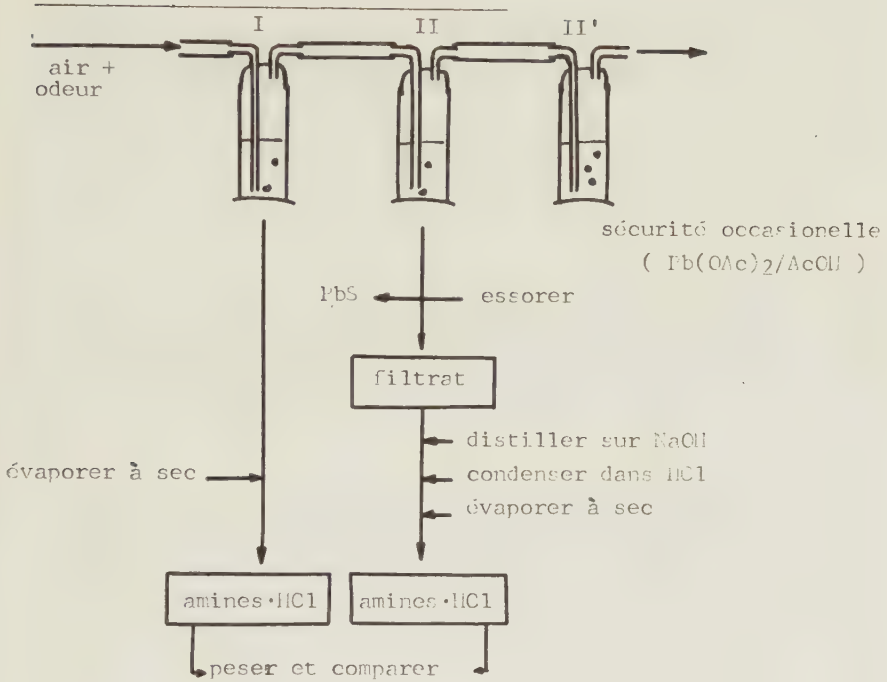
$$H_2S + Pb(OAc)_2 \longrightarrow \underline{PbS}\downarrow + 2AcOH$$

De plus, ceci devait permettre de le séparer des thiols éventuels (qui seront retenus dans le flacon III) et faciliter ainsi l' analyse de ces derniers. La présence ou l' absence d' un précipité noir dans le flacon II nous fixait sur celle de l'acide sulfhydrique dans l' odeur du champignon.

Accessoirement le flacon II allait encore être utilisé en vue d' un autre but: nous désirions en effet savoir si l' absorbtion des amines dans le flacon I était satisfaisante. Si oui, leur quantité dans le flacon II devait être modeste. Il suffisait, après essorage de l' éventuel précipité de PbS, de distiller le filtrat alcalinisé et de recevoir le distillat dans l' acide chlorhydrique dilué (fig. 21). Le résidu de l' évaporation de ce dernier nous fixerait alors sur la quantité d' amines ayant passé dans le flacon II. Deux essais effectués sur des échantillons de 50 champignons ont montré que ce résidu ne représentait que le 0,2, respectivement 0,35% de celui résultant de l' évaporation de l' HCl du flacon I, ce qui démontrait la bonne absorbtion des amines dans ce premier flacon.

D' autre part, en branchant après le flacon II, un flacon contenant la même solution d' acétate de plomb, nous pouvions vérifier l' efficacité de cette solution pour le captage de l' acide sulfhydrique, aucun dépôt de PbS ne se formant dans le flacon de sécurité.

Fig. 21: utilisation du flacon II.



III. 2. Analyse des échantillons.

III. 2. 1. Phallus impudicus.

Il n'est pas dans notre intention de reproduire ici un tableau complet des très nombreux essais effectués sur des champignons jeunes, de quelques heures ou vieux, et dont le nombre par échantillon variait de 1 à 50. Tige et chapeau ont évidemment été séparés et étudiés parallèlement. Plus tard, dans la structure même du chapeau, nous devions également différencier la glèba et la carcasse à lo, ettes, ce qui nous a amené à une constatation intéressante (voir plus loin).

De façon générale on peut constater, pour la tige comme pour le chapeau, que le dégagement de H_2S commence rapidement, c'est-à-dire de 3 à 4 heures après la sortie du champignon. Dans la première journée, ce dégagement semble passer par un maximum pour devenir très faible après seulement 24 heures. On remarque également que le champignon produit relativement peu de H_2S, puisque nous trouvons en moyenne:

- pour 50 tiges de 0 - 72 heures: 3.1 mg PbS,
- pour 50 chapeaux de 0 - 72 heures: 8.2 mg PbS.

Compte tenu du rapport des poids atomiques du plomb et du soufre, cette production devient donc très modeste, et ce n'est que dans le cas d'échantillons relativement grands que nous avons pu recueillir un véritable précipité. Dans la plupart des cas, nous avons dû nous contenter de constater un dépôt brun à noir plus ou moins fort à l'intérieur du tube plongeant dans le flacon laveur.

Comme indiqué plus haut, les deux parties distinctes du chapeau, la glèba (fertile) et la carcasse (non-fertile) ont été séparées également, ce qui nous a permis de voir que seule la seconde, faisant partie du réceptacle comme la tige (fig 36), dégageait de l'acide sulfhydrique. Ceci montre bien que la différence entre ces deux organes n'est pas seulement profonde du point de vue anatomique.

III. 2. 2. Anthurus archeri.

Comme précisé dans la partie générale, glèba et réceptacle n'ont pas été séparés dans ce champignon et l'analyse porte sur l'odeur de leur ensemble. Le dégagement de H_2S, qui commence également quelques heures après la sortie du champignon, est ici aussi relativement faible, puisque nous n'avons obtenu que 6 mg de PbS pour 50 Anthurus dont l'odeur a été absorbée pendant les 72 premières heures après leur sortie du péridium.

III. 2. 3. Mutinus caninus et Clathrus ruber.

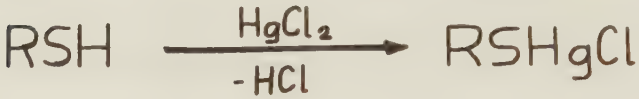
Malgré le très petit nombre d'échantillons, nous avons pu nettement déterminer la présence de H_2S dans ces deux Gastéromycètes:

échantillon	détail	dépôt PbS
C_{21}	7 Mutinus caninus	+
D_{21}	4 jeunes Clathrus ruber	+
D_{22}	2 vieux Clathrus ruber	±

IV. FLACON III. LES THIOLS.

IV. 1. Méthode analytique.

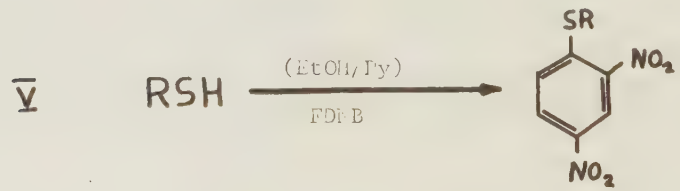
Les thiols éventuellement présents dans l'odeur des champignons sont retenus dans le flacon III de la manière suivante:



Selon la littérature (22), il se formerait en partie aussi $RSHgCl \cdot HgCl_2$.

Contrairement à ce que laisse supposer la forte affinité des thiols pour Hg^{++}, cette réaction n'est pas très rapide, et un barbotage trop fort provoque des pertes de substances. La stabilité du sel obtenu, par contre, est remarquable, et si elle favorisait le stokage à long terme des thiols naturels, elle n'a pas facilité leur identification. En effet, ces sels sont pratiquement insolubles dans tous les solvants; ils sont difficilement décomposables et séparer un mélange éventuel en ses constituants semblait un problème aride que les faibles éléments de la littérature ne devaient pas nous aider à résoudre.

Un autre type de dérivé des thiols, les 2,4-dinitrophénylthioéthers (DNPTE), paraissait poser beaucoup moins de problèmes:



Les points de fusion de ces substances sont nets et la séparation d'un mélange par ccm possible.

L'identification des thiols sous forme de dérivés 2,5-dinitrothiobenzoate ne semble pas adéquate ici, le dérivé méthyl étant liquide à température ordinaire (23). De même, les dérivés p,p'-nitrophénylazoleazoyle ne nous convenaient pas, la condition étant d'obtenir d'abord le thiol sous forme liquide et le temps de réaction étant de deux jours (26).

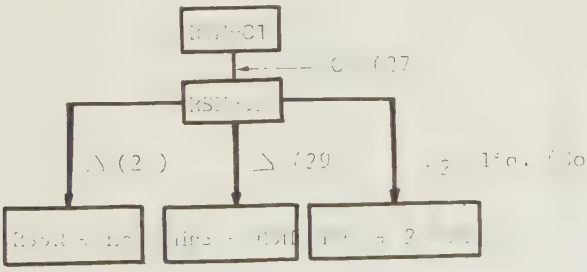
L'exécution de la réaction V, cependant, demande la rupture préalable de la liaison Hg^{II}—S et nous avons procédé dès lors à une serie d'essais de libération des thiols à partir de leur liaison mercurique. Par exemple, l'attaque du sel par une base forte devait d'abord donner:

I [illegible] + 2 NaOH ⟶ [illegible]

Cette réaction, suivie par la libération du thiol en milieu acide et par la réaction V nous menait, théoriquement, à l'obtention du dérivé 2,4-dinitrophénylthioéther.

Nous devions cependant remarquer que si la réaction I est rapide, elle se fait pourtant avec un rendement n'excédant jamais quelques pourcents. L'explication paraît d'ailleurs simple: le précipité de HgO formé à la surface des grains du sel à attaquer constitue une couche imperméable empêchant la poursuite de la réaction. Même une pulvérisation très fine du sel n'augmente pas le rendement dans une mesure suffisante. Il nous restait alors deux possibilités:

a)



b) l'attaque du sel par un acide fort, réaction dont nous n'avons pas trouvé trace dans la littérature. Un essai préliminaire ayant montré que l'adjonction d'acide sulfurique à 50 % au sel mercurique détermine une nette odeur du thiol pendant plusieurs jours, nous nous sommes penché sur cette réaction qui, bien que lente, n'est pas bloquée par un dépôt insoluble au niveau des grains du sel à attaquer. Cependant, sa lenteur devait nous poser le problème de l'instabilité de la solution de 2,4-dinitrofluorobenzène dans le mélange éthanol-pyridine permettant d'obtenir le dérivé 2,4-dinitrophénylthioéther désiré. La difficulté a finalement été contournée en stockant le thiol dans une solution de KOH à 50 %, d'où il peut être libéré en quelques minutes par l'action d'un acide. D'où la suite de réactions :

II $RSHgCl \xrightarrow{H^+} RSH$ décomposition

III $RSH + KOH \longrightarrow RSK + H_2O$ stockage

IV $RSK \xrightarrow{H^+} RSH$ libération

V $RSH \xrightarrow[(EtOH/Py)]{FDNB} DNPTE$ synth. dérivé

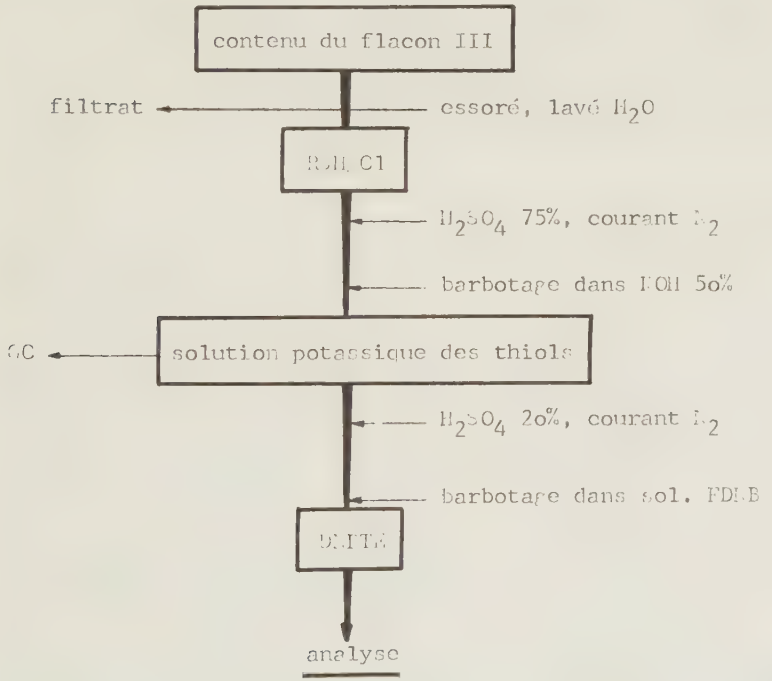
Les essais à blanc donnent le résultat suivant pour la réaction II :

Sel	H_2SO_4	Temps	Temp.	Décomp.
[illegible]HgCl	75%	336 h	ord.	90%
[illegible]HgCl	75%	220 h	ord.	83%
[illegible]HgCl/[illegible]HgCl	75%	220 h	ord.	92%

Les réactions III et IV ne posent pas de problèmes et la réaction V, avec un peu de pratique, se conduit avec un rendement de 85 - 90 %, la seule difficulté résidant dans la cristallisation du dérivé, qui est très pénible en cas de présence d'un excès de FDNB.

D'autre part, une confirmation des résultats par GC peut être obtenue en analysant la solution de KOH intermédiaire par la méthode b), ce qui nous donne le schéma général de la fig 22.

Fig. 22: schéma analytique des thiols.



IV. 2. Analyse des échantillons.

IV. 2. 1. Phallus impudicus.

IV. 2. 1. 1. $A_{3.1}$: dérivé mercurique de l'odeur de 50 tiges de Phallus.

Le spectre IR du précipité blanc essoré, lavé à l'eau et séché (972.9 mg) montre une grande similitude avec celui du dérivé mercurique du méthanethiol. Le point de fusion établ (190-240 °C) et l'analyse élémentaire montrent que la composition du dérivé est mal définie, comme c'est souvent le cas pour les composés mercaptomercuriques. Suivant notre schéma analytique, nous soumettons 470 mg du sel à la décomposition par l'acide sulfurique. Le(s) thiol(s) absorbé(s) par la solution de KOH sont analysés par GC selon la méthode b. Cet examen (fig 24) nous montre que nous sommes sans doute en présence de méthanethiol seul. Le dérivé DNPTE obtenu à partir de la solution potassique est chromatographié en ccm. (fig 23).

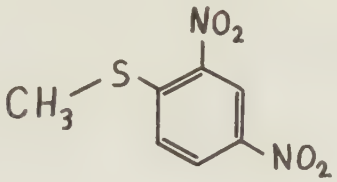
Fig. 23: ccm de A_{31}-DNPTE.

Phase stat.: GF_{254}, 0.25 mm
Phase mob.: 1 et 7
Front: 10 cm
Temp.: ambiante

T: DNPTE de
1) éthanethiol
2) méthanethiol

Dépôts: 1 µl de sol. à 1% ds $CHCl_3$.

A côté du FDNB non-réagi, on trouve seulement la tache du méthyl-DNPTE, ce qui confirme le résultat de la GC. Une recristallisation difficile (à cause de la présence du FDNB) conduit à une substance cristalline jaune dont le point de fusion (124-126 °C) est proche de celui du méthyl-DNPTE (128°C). L'empreinte du spectre IR correspondant à celle de cette dernière substance, nous pouvons conclure à l'identité de notre dérivé avec



ce qui prouve bien la présence du méthanethiol dans l'odeur des tiges de Phallus.

Du point de vue quantitatif, on remarque que le dégagement du thiol commence fortement dès la sortie du champignon de son péridium et devient déjà faible après seulement 24 heures. En effet, pour un échantillon (A_{32}) de 30 pieds de Phallus, nous avons obtenu 297 mg de dérivé mercurique pendant les 24 premières heures et 36 mg seulement pendant les 48 heures suivantes.

IV. 2. 1. 2. A_{32}: dérivé mercurique de l'odeur de 50 chapeaux de Phallus.

Le précipité lavé et séché de 442.8 mg montre en IR et analyse élémentaire un comportement analogue à celui de A_{31}. Sa décomposition par l'acide sulfurique a également été entreprise et l'analyse par GC de la solution de KOH (fig. 24) donne qualitativement le même résultat que celle de A_{31}.

Le passage au dérivé DNPTE, cependant, a été plus difficile et la recristallisation empêchée du fait de la présence d'une trop grande quantité de FDNB non-réagi, comme le montre une ccm (fig 25). Comme pour A_{31}, on constate que seul le méthyl-DNPTE est présent en quantités décelables, ce qui confirme l'analyse par GC.

IV. 2. 1. 3. B_{31} : dérivé mercurique de l'odeur de 35

Anthurus arch.

Le précipité blanc lavé et séché pèse 84.1 mg et son spectre IR montre ici encore une grande similitude avec celui de MeSHgCl. Le sel est décomposé par l'acide sulfurique selon le schéma habituel et le(s) thiol(s) reçu(s) dans le KOH 50 %. L'étude par GC de cette solution a été rendue difficile par la petite quantité de thiol qu'elle contenait. A cause de la grande sensibilité à la détection, le chromatogramme a dû être comparé à celui d'un essai à blanc (fig 26). Cette comparaison montre cependant clairement la présence de CH_3SH dans notre échantillon.

fig 24 : GC des thiols de A_{31} et A_{33}.

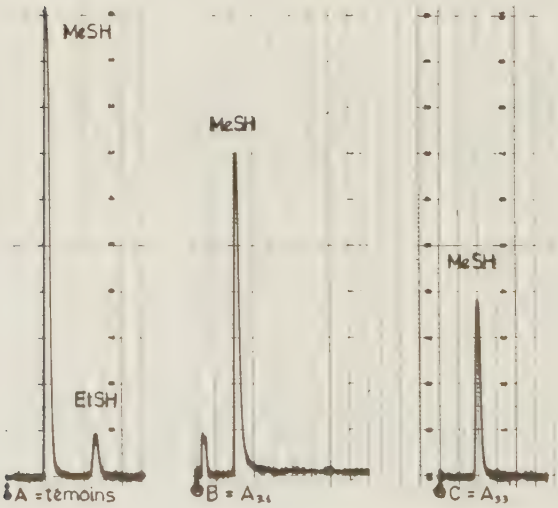


Fig. 25 : comparaison des A_{33}-Diol et B_{31}-Diol.

Les conditions expérimentales et les témoins sont les mêmes que dans la figure 23, page 40.

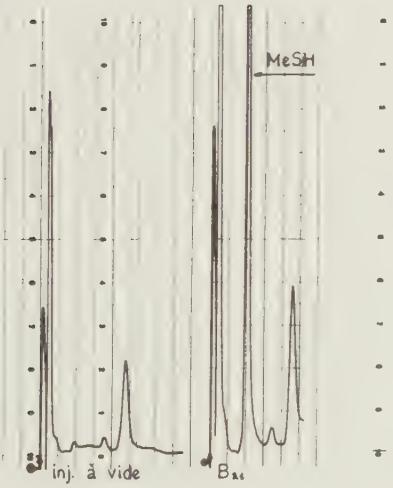


Fig. 26 : CC des thiols libres de B_{31}.

La solution potassique a également été utilisée pour la synthèse du dérivé D ITE. La cce (fig. 25) du dérivé montre, à côté de la forte tache du réactif FDNB celle, très faible, du méthyl-DNPTE, corroborant ainsi le résultat obtenu en GC. Là encore, cependant, le dérivé était présent en quantité trop faible pour pouvoir être cristallisé et une confirmation supplémentaire par spectroscopie IR n'a pu être apportée.

IV. 2. 1. 4. C_{31}: dérivé mercurique de l'odeur de 7 Mutinus can.

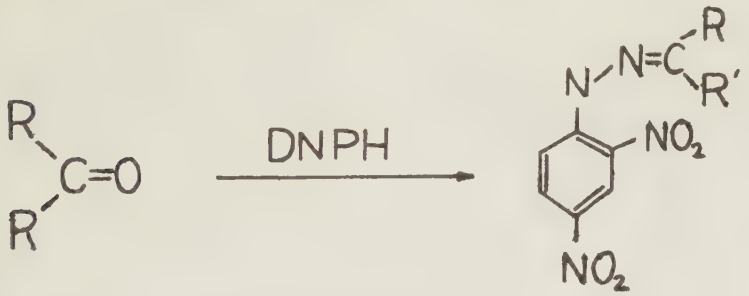
et D_{31}: dérivé mercurique de l'odeur de 4 Clathrus rub.

Dans ces deux cas, du fait du petit nombre de champignons à disposition, nous n'avons pu que constater la formation d'un dépôt blanc sale dans le tube plongeant dans la solution de $HgCl_2$. Ce dépôt est insoluble dans l'eau, et sans qu'il soit une preuve absolue de la présence de thiol(s) dans ces champignons, celle-ci n'en est pas moins très probable.

V. FLACON IV: LES COMPOSES CARBONYLES.

V. 1. Méthode analytique.

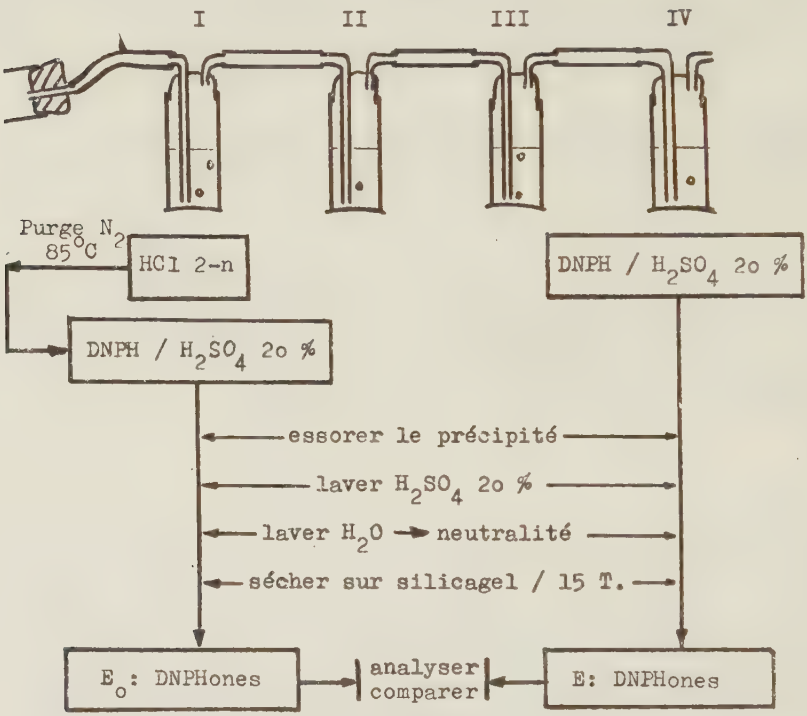
Les composés carbonylés volatils sont précipités dans le quatrième flacon sous la forme de leurs 2,4-dinitrophényl-hydrazones (DNPHones):



Remarquons cependant d'emblée que s'ils sortent sans doute chimiquement indemnes du passage dans les trois flacons précédents, ils n'en sont pas moins partiellement solubilisés, donc plus ou moins retenus dans ces flacons, le faible courant d'air qui passe dans le système ne constituant pas une purge suffisante pour les en éliminer quantitativement. Il faudra donc, avant l'analyse des amines du flacon I, faire une purge à chaud de ce dernier en conduisant les composés ainsi entraînés dans une solution de 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH). Par l'examen des DNPHones formées en ccm, on pourra constater si certains composés carbonylés y sont restés bloqués, sans parvenir jusqu'aux flacons suivants. Un examen similaire des solutions des flacons II et III n'a pas été jugé utile, le milieu (aqueux acide) étant comparable à celui du premier flacon. Le schéma analytique général sera donc celui de figure 27.

Les DNPHones sont d'excellents dérivés pour l'analyse des composés carbonylés. Etudiées depuis longtemps, les caractéristiques physiques d'un grand nombre d'entre elles sont bien connues. Leur séparation en ccm a fait l'objet de nombreux travaux (1, 17, 18), que ce soit en ccm analytique ou encore préparative.

Fig. 27. L'analyse des composés carbonylés.



Le précipité du flacon IV pouvait donc être soumis sans autre à une analyse, puis à une éventuelle séparation par cette méthode.

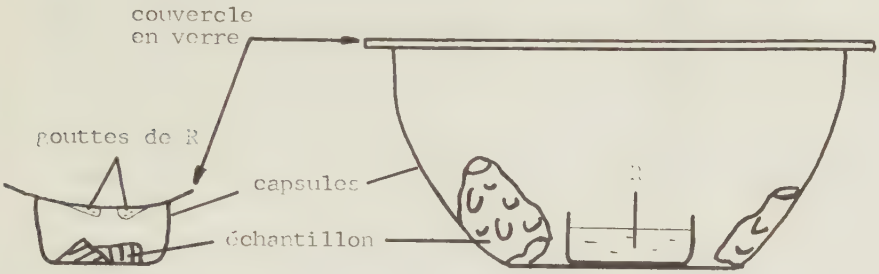
V. 2. Analyse des échantillons.

V. 2. 1. Phallus impudicus.

Une constatation frappante devait être faite ici dès le tout-début de nos captages d'odeur, les échantillons de tiges donnant une réponse tout à fait différente de ceux des chapeaux. En effet, si la solution de DNPH restait limpide dans le premier cas, il n'en était pas de même du second. Une série d'essais micro et semi-micro devaient nous confirmer pleinement ce résultat (fig. 28).

Fig. 28. Schémas des essais micro et semi-micro.

Echelle d'environ 1/1



R: DNPH / H_2SO_4 20%

La formation de cristaux de DNPHones dans R indique un résultat + .

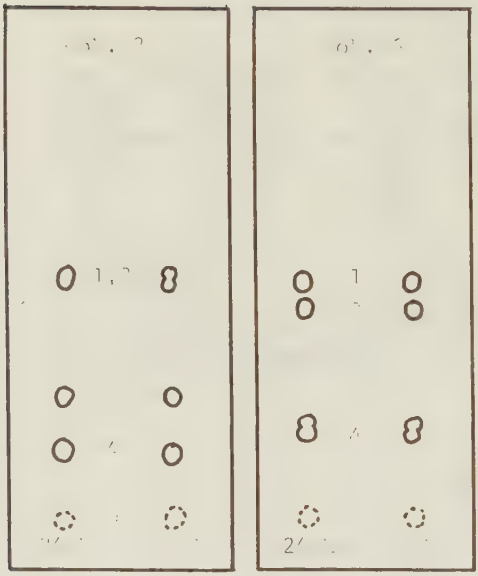
Resultats:

procédé / échantillon	micro			semi-micro	
chapeau	+	+	+	+	+
tige	-	-	-	-	-
essai à blanc	-	-	-	-	-

Les DNPHones formées dans le test semi-micro pour l'échantillon de chapeaux ont été chromatographiées sur couche mince. Que l'essai ait duré 24 heures ou 3 jours, le nombre des taches est le même (fig 29).

Il est apparu que la phase mobile 2 (cyclohexane / $CHCl_3$ / AcOEt; 70/20/10/; v/v/v) ne séparait que mal les taches 1 et 2, alors que la phase mobile 6 (CCl_4 / Cyclohexane / AcOEt; 100/20/5; v/v/v/), au contraire, a laissé les taches 3 et 4 pratiquement confondues. Ces tests préliminaires ont été suivis d'analyses d'échantillons plus considérables.

Fig. 29. Ccm des DNPHones du chapeau de Phallus.



Phase stat. : GF_{254}, 0.25 mm

Phase mob. : 2 et 6

Temp. : ordinaire

Sat. : 1h buvard

Echantillons : en solution

AcOEt à 1%

Dépôt : 1 µl

V. 2. 1. 1. A_{41}: DNPHones de l'odeur de 58 chapeaux.

Le précipité du flacon IV est essoré, lavé avec H_2SO_4 20%, puis avec de l'eau jusqu'à neutralité. On le sèche alors sur silica-gel sous 15 mm de Hg environ. Son poids sec est de 380.6 mg. Les ccm effectuées selon le même mode que précédemment donnant un résultat identique, nous avons soumis ce précipité à la ccm préparative. Le développement des bandes avec la phase mobile 2 nous donne schématiquement le dessin de la figure 30.

La nouveauté est ici l'apparition de deux bandes mal séparées et d'intensité très faible (5 et 6). La bande D, dont le hRf est de 0 environ correspond à la DNPH, comme le montrera son analyse. Les bandes sont alors récupérées séparément et le gel extrait à l'acétate d'éthyle jusqu'à sa décoloration complète. Après évaporation du solvant des divers extraits, la séparation de 150 mg de A_{41} par cette méthode a donné: 46.3 mg de DNPHones provenant des bandes 1 et 2, 56.7 mg de DNPHones de la bande 3 et 5 mg de DNPHones de la bande 4. Les bandes 5 et 6 , par contre, n'ont donné ensemble qu'un résidu de environ 2 mg, constitué en majeure partie de gel de silice souillé par de très petites

quantités des deux substances, ce qui nous a amené à ne pas tenter leur isolation, et à essayer de nous en faire une idée par ccm analytique. La substance de la bande D a également été extraite, puis recristallisée de l' éthanol dilué. Sa migration pratiquement nulle en ccm et son point de fusion de 189-193 °C font penser à la DNPH non transformée, ce que son spectre IR ne fait que confirmer.

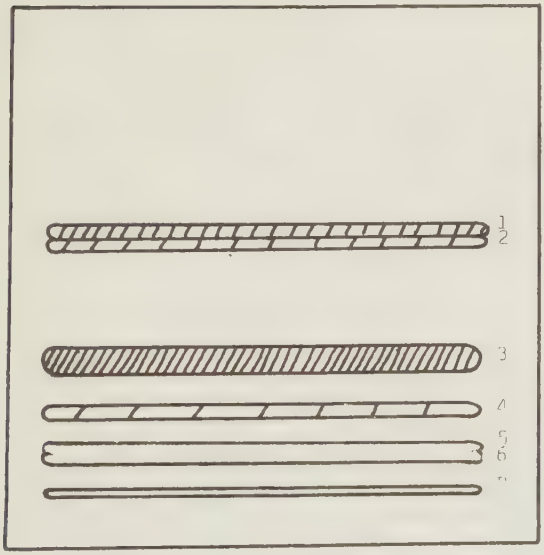
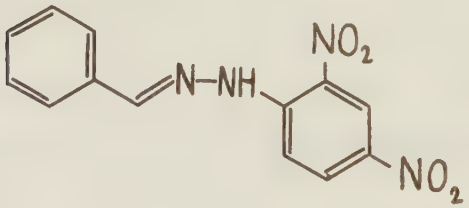


Fig. 3o: ccm prép. des DNPHones de Phallus.

Phase stat.: GF_{254}, 1 mm
Phase mob. : 2
Température: ordinaire
Saturation : buvard
Dépôt : o.5 ml en sol. AcOEt saturée
Echelle : 1/2

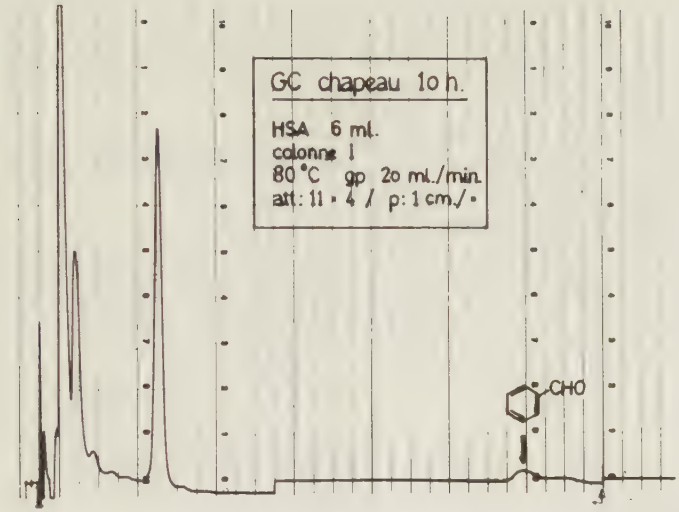
Pour pousser l'analyse des constituants plus loin, il fallait commencer par séparer les deux constituants de la double bande 1 et 2, ce qui a été réalisé par une ccm préparative au moyen d'un quintuple développement avec la phase mobile 6. Cette opération nous a permis d'isoler 39 mg de DNPHone de la bande 1 et 3.6 mg de DNPHone de la bande 2. La recristallisation de 1 de l'éthanol dilué nous donne un composé dont le PF est de 232 -235 °C, proche de celui de la benzaldéhyde-DNPHone (237 °C). Le point de fusion mixte inchangé ne fait que confirmer ce rapprochement. En ccm, tant avec la phase mobile 2 qu'avec la phase mobile 6, les deux substances montrent le même comportement. Le spectre IR de 1 correspondant exactement avec celui de la benzaldéhyde-DNPHone, nous avons là la preuve que le composé isolé est bien:



Ce résultat devait encore être confirmé d'une manière frappante par l'analyse en GC du matériel vivant par la méthode a). En effet, comme nous le verrons encore plus loin, seul le chapeau donne en GC un signal correspondant à une substance dont le temps de rétention, dans nos conditions (cf fig. 31) est de 24.8 min, ce qui correspond exactement à celui du benzaldéhyde.

L'analyse de la substance 2 devait poser plus de problèmes. Les 3.6 mg de résidu récupérés semblent en effet constitués en grande partie de gel de silice provenant de la chromatographie préparative et ne pouvant être séparé par filtration de la solution de DNPHone. Un point de fusion a cependant été pris: l'énorme intervalle de fusion (221 - 258 °C sans fusion complète), accompagné d'une décomposition de la substance, montre malgré tout que nous ne sommes sans doute pas en présence de l'un des composés isolés par Freund, les PF de leurs dérivés ne dépassant jamais 202 °C. Ce fait devait être immédiatement confirmé par une analyse en ccm avec les phases mobiles 2 et 6 (cf fig. 32)

Fig. 31.



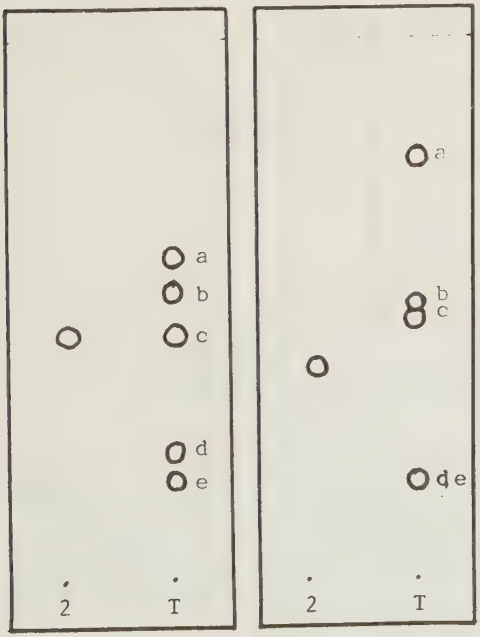


Fig. 32. Ccm de la subst. 2 par rapport aux subst. de Freund.

Phase stat.: GF_{254}, 0.25 mm
Phase mob. : 2 et 6 respect^{t}.
Temp. : ordinaire
Sat. : buvard
Dépôt : 1 µl sol.AcOEt 1%
Témoins : DMPHones de

a) dihydrochalcone
b) phénylacétaldéhyde
c) α-phénylcrotonaldéhyde
d) acétaldéhyde
e) formaldéhyde

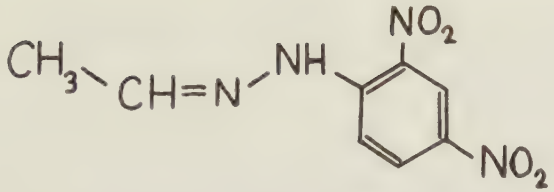
Notre attention fut alors attirée par deux aldéhydes relativement simples dont les DNPHones possèdent un PF de 254 - 255 °C, accompagné par une décomposition de la substance: il s'agit de l'anisaldéhyde et du cinnamaldéhyde. Ce dernier présente d'ailleurs une certaine similitude avec l'α-phénylcrotonaldéhyde isolé par Freund. L'analyse par ccm (cf fig. 33) devait nous montrer que si on peut écarter résolument l'hypothèse de l'anisaldéhyde, il n'en est pas de même avec celle du cinnamaldéhyde.
Que l'on développe avec la phase mobile 2 ou 6, la substance 2 possède en effet le même hRf que la cinnamaldéhyde-DNPHone.

Fig. 33. Ccm de la subst. 2 par rapport à d'autres tém.

Phase stat.: GF_{254}, 0.25 mm
Phase mob. : 2 et 6 respect^{t}.
Temp. : ordinaire
Sat. : buvard
Front : 15 cm
Dépôt : 1 µl sol. AcOEt 1%
Témoins : DNPHones de
a) cinnamaldéhyde
b) anisaldéhyde

Malheureusement une preuve plus solide par spectroscopie IR n'a pas pu être apportée, la substance 2 étant tellement souillée par le gel de silice que tout le spectre en est obscurci par un intense bruit de fond. Pour l'instant donc, aucune conclusion formelle ne peut encore être formulée au sujet de la présence de cet aldéhyde dans le chapeau de Phallus imp.

L'analyse de la substance 3 devait s'avérer plus facile. Une recristallisation de l'éthanol dilué nous a donné un composé dont le point de fusion est de 162 - 164 °C, ce qui pouvait, compte tenu de son comportement en ccm (cf fig. 34), faire penser à l'acétaldéhyde-DNPHone. Un point de fusion mixte sans dépression avec cette dernière substance devait confirmer notre hypothèse et la comparaison des spectres IR des deux composés allait nous apporter la preuve définitive de l'identité de 3 avec :



Quant à la substance 4, nous n'avons pu l'identifier à ce jour. Les quelques mg obtenus, très fortement souillés par du gel de silice, n'ont pu être recristallisés convenablement. Son point de fusion semble être supérieur à 260 °C, température à laquelle la substance se décompose. De ce fait, et sur la foi des ccm avec les phases mobiles 2 et 6 (cf fig. 34), nous pouvons remarquer qu'il ne peut s'agir de la formaldéhyde-DNPHone. On constate même, comme d'ailleurs pour les bandes très faibles 5 et 6, que le hRf est inférieur à celui de la formaldéhyde-DNPHone alors que dans nos conditions, il devrait croître avec le nombre croissant d'atomes de C. Il pourrait dès lors s'agir de produits de décomposition.

Fig. 34. ccm des subst. 3 et 4 par rapport aux HCHO et CH_3CHO-DNPHones.

Phase stat. : GF_{254}, 0.25 mm
Phase mob. : 2 et 6 resp^{t}.
Temp. : ordinaire
Sat. : buvard
Dépôt : 1 µl sol. AcOEt 1%
Témoins : DNPHones de
a) acétaldéhyde,
b) formaldéhyde,
Front : 15 cm .

Purge du flacon I

Elle est nécessitée pour les raisons citées sous V.1. Avant l'analyse des amines captées dans ce flacon, on en effectue une purge à l'azote à une température de 85 °C. Le courant d'azote, entraînant les éventuels composés volatils, barbote ensuite dans une solution de DNPH sulfurique. L'éventuel précipité formé subira alors la même analyse que les DNPHones du flacon IV. Après une durée de 56 heures, aucun précipité frais ne se formant plus, l'opération est stoppée; elle a permis d'obtenir 18.6 mg de précipité sec dont l'analyse par les ccm habituelles (cf fig. 35) n'apporte aucune nouveauté par rapport à celle de l'échantillon A_{41}, si ce n'est l'absence de la curieuse tache 4. La formaldéhyde-DNPHone, quant à elle, n'est pas présente dans le précipité.

Fig. 35 Ccm des DNPHones de la purge du flacon I par rapport à A_{41}.

Phase stat.: GF_{254}, 0.25 mm
Phase mob. : 2 et 6 respect^{t}.
Temp. : ordinaire.
Sat. : buvard
Front. : 15 cm
Dépôt : 1 µl sol.AcOEt 1%

V. 2. 1. 2. A_{42} : DNPHones de l'odeur de 23 chapeaux.

Le précipité essoré, lavé par H_2SO_4 20% puis avec de l'eau jusqu'à neutralité, séché sur silicagel sous 15 mm de Hg, pèse 194.5 mg . Son analyse, puis sa séparation par ccm ne montrent qu'une variation d'ordre quantitatif par rapport à A_{41}:

- Bandes 1 et 2 : 33.4 mg
- Bande 3 : 108.0 mg
- Bande 4 : 4.2 mg

L'analyse des substances séparées confirme celle de A_{41} en tous points, sans rien apporter de définitif quant à la bande 2. La purge du flacon I à l'azote ayant été faite en même temps que celle de l'échantillon V.2.1.1., son résultat est identique.

V. 2. 1. 3. Examen d'autres échantillons.

Puisque les aldéhydes de l'odeur de Phallus semblaient provenir du chapeau du champignon uniquement, il devenait intéressant de voir si la glèba seule en était responsable, ou si la carcasse à logettes (fig. 36), faisant partie du réceptacle, participait également à ce phénomène.

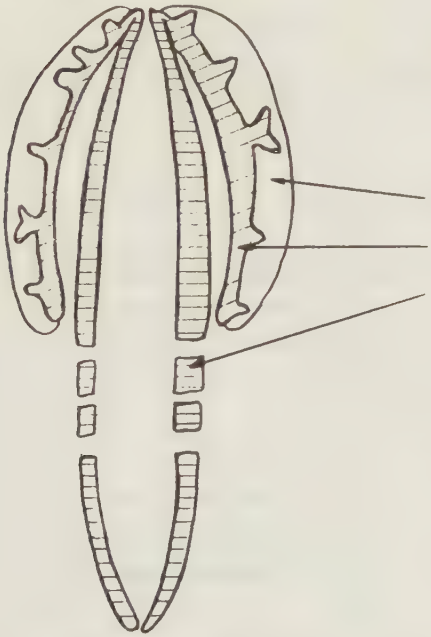


Fig. 36. Un peu de vocabulaire

NB: du point de vue botanique, seuls les termes "glèba" (ou glèbe) et "réceptacle" sont rigoureusement corrects.

Plusieurs essais ont été faits, portant sur des échantillons jeunes (jusqu'à 24 heures), un peu plus âgés (jusqu'à 48 heures) et vieux (jusqu'à 10 jours), afin d'observer les variations éventuelles. Pour les essais de 24 heures et 10 jours, le dispositif utilisé était celui présenté sous V.2.1.: essais préliminaires semi-micro. L'essai avec les chapeaux de 0 - 48 heures a été entrepris, par contre, dans l'installation classique de captage. Nous aurons trois échantillons par essai: glèba, carcasse et un blanc.

temps / org.	24 h 1 chapeau	48 h 25 chapeaux	10 j 4 chapeaux
carcasse	Ca_1: aq. cristaux	Ca_2: 14 mg	Ca_3: 65.2 mg
gléba	Gl_1: aq. cristaux	Gl_2: 3 mg	Gl_3: 96.7 mg
stipe	-----	-----	-----

Les cristaux sont recuperés, lavés et séchés, dissous dans l'acétate d'éthyle et analysés par ccm. Les resultats obtenus sont presentés dans le tableau 5.

Tabl. 5. Le dégagement des aldéhydes dans les différentes parties du chapeau

échant.	ccm phase mobile 1	ccm phase mobile 6
Ca_1	CH_3CHO, substance 4, benzaldéhyde cont. av. 1	CH_3CHO, benzaldéhyde, substances 2 et 4
Ca_2	idem	idem
Ca_3	idem	idem
Gl_1	benzaldéhyde	benzaldéhyde
Gl_2	CH_3CHO, substance 4, benzaldéhyde	CH_3CHO, substance 4, benzaldéhyde
Gl_3	idem	idem

On y remarque que seule la carcasse, dès le début, semble dégager la substance 1; la gléba, jeune ou âgée, ne paraît pas émettre de composé. De plus, si la carcasse semble dégager d'emblée tous ses aldéhydes, il n'en est pas de même pour la gléba, qui commence à produire le acétaldéhyde le premier jour, puis l'acétaldéhyde et

la substance non-identifiée 4 dès le 2é jour.

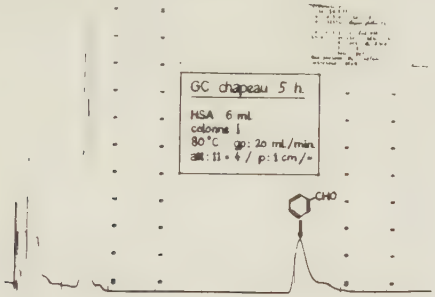


Fig. 37 a: le dégagement du benzaldéhyde du chapeau de Phallus 5 h après la rupture du péridium.

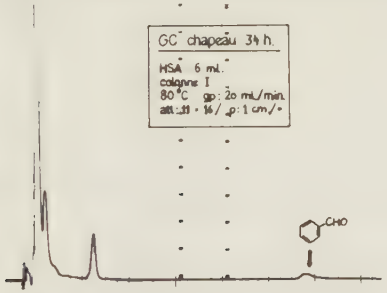


Fig. 37 b: le même dégagement 34 h après la rupture du péridium.

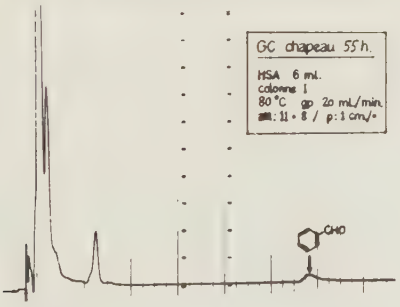


Fig. 37 c: le même dégagement 55 h après la rupture du péridium.

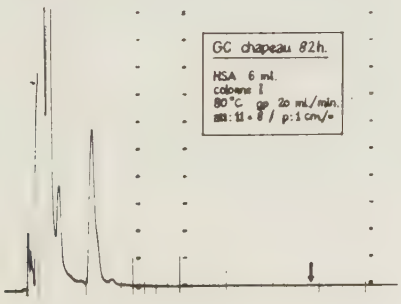


Fig. 37 d: le même dégagement 82 h après la rupture du péridium.

On voit également, que la production globale d'aldéhydes augmente fortement avec l'âge, puisque quatre chapeaux, en dix jours, ont donné près de dix fois plus de DNPHones que 25 chapeaux traîtés pendant leurs 48 premières heures. Bien qu'en toute rigueur ces deux captages ne se soient pas déroulés exactement de la même façon, cette énorme différence semble bien montrer que certaines substances voient leur production augmenter brusquement à un moment où le champignon commence à se décomposer. Avec les amines, nous avions un comportement analogue, la production de NH_3 et de triméthylamine augmentant brusquement à partir du troisième jour. A cet égard, le dégagement du benzaldéhyde peut être cité comme modèle d'un comportement inverse. Commençant dans la carcasse du chapeau dès la sortie du champignon de l'oeuf, celui-ci cessera pratiquement au bout d'environ 80 heures, soit en moins de quatre jours, comme le montrent les chromatogrammes GC de la fig. 37. Nous reviendrons au chapitre suivant sur la signification possible de ce phénomène.

V. 2. 2. Anthurus archeri.

Il devait apparaître d'emblée que l'Anthurus de l'archer dégageait beaucoup moins d'aldéhydes que le Phallus impudique.

V. 2. 2. 1. B_{41}: DNPHones de l'odeur de 40 Anthurus.

Essoré, lavé et séché, B_{41} ne pèse que 13 mg. Son analyse en ccm avec les phases mobiles 2 et 6 donne le résultat suivant, tiré de la fig. 38: La comparaison des taches de l'échantillon avec celles des témoins indique la possibilité de la présence des formaldéhyde, acétaldéhyde et phénylacétaldéhyde-DNPHones.
Une autre substance dont le hRf est inférieur à celui de la benzaldéhyde-DNPHone est également présente. De plus, si l'on effectue un dépôt initial de 5 ou 7 µl, une tache dont le déplacement est le même que celui de la benzaldéhyde-DNPHone apparaît dans les deux ccm.

Estimant l'échantillon trop petit pour être soumis à une ccm préparative, nous l'avons réuni avec B_{42}.

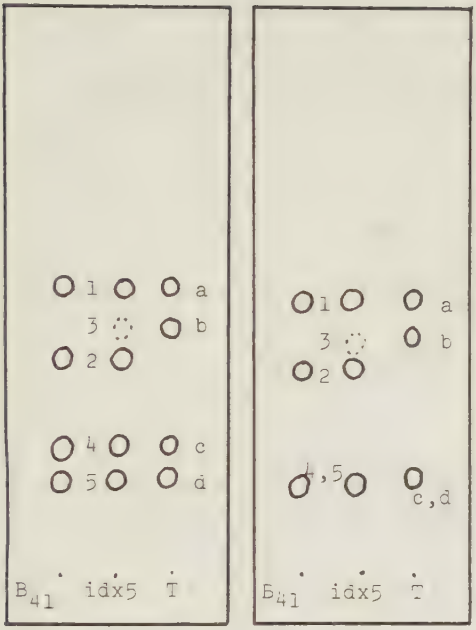


Fig. 38. ccm de B_{41}.

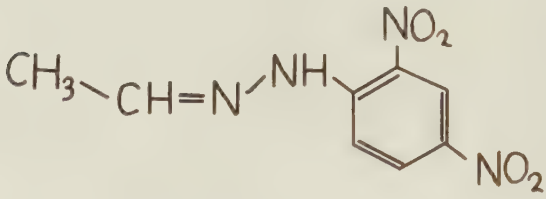
Phase stat.: GF_{254}, 0.25 mm
Phase mob. : 2 et 6 respect^{t}.
Temp. : ordinaire
Sat. : buvard
Front : 15 cm
Dépôt : 1 µl sol.AcOEt 1%
Témoins : DNPHones de

a) phénylacétaldéhyde,
b) benzaldéhyde,
c) acétaldéhyde,
d) formaldéhyde.

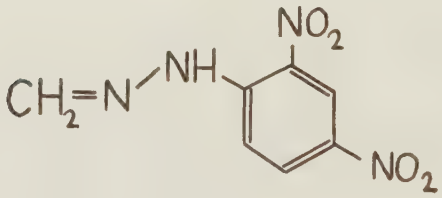
V. 2. 2. 2. B_{42}: DNPHones de l'odeur de 90 Anthurus.

Essoré, lavé et séché, celui-ci pèse 36.4 mg. Les ccm habituelles donnent un résultat identique à celui de B_{41}. Les deux échantillons sont donc réunis et une séparation de leurs constituants tentée par ccm préparative. Cette dernière nous a permis d'obtenir environ 3 mg des substances 1 et 3, des traces de la substance 2, 21 mg de 4 et 16 mg de 5. La faible quantité des trois premières substances, par ailleurs fortement souillées par le gel de silice, nous a amené à nous en faire une idée uniquement par ccm. Sans que leur détermination puisse être tenue pour certaine, nous pouvons cependant remarquer que 1 a le même hRf que la phénylacétaldéhyde-DNPHone et 3 celui de la benzaldéhyde-DNPHone, ceci avec les deux phases mobiles 5 et 6. Quant à 2, nous ne pouvons constater ici que le fait que son hRf est très proche de celui de la substance 2 de Phallus imp., mais rien ne peut en être dit pour l'instant. Pour identifier ces trois substances de façon certaine, il faudrait travailler avec un plus grand nombre de champignons, ce que nous n'avons pas eu le temps de faire.

Les composés 4 et 5 ont pourtant pu être identifiés avec certitude. En effet, 4 recristallisé de l'éthanol dilué possède un PF de 162 - 166 °C, proche de celui de l'acétaldéhyde-DNPHone. Le PF mixte sans dépression ne fait que corroborer ce résultat et le spectre IR montre de façon claire que 4 est bien identique à



La substance 5, recristallisée avec difficulté à cause de la présence de passablement de gel de silice, a un PF de 161 - 164 °C, ce qui semble bien montrer la justesse de l'hypothèse de la formaldéhyde-DNPHone. L'empreinte du spectre IR ne fera que confirmer l'identité de 5 avec



Il restait à examiner, au moyen d'une purge à l'azote semblable à celle effectuée pour Phallus (V.2.1.1.), si le flacon I de nos deux échantillons ne pourrait contenir en solution des aldéhydes étrangers à ceux captés dans le flacon IV. Les DNPHones récupérées de cette manière ayant été chromatographiées au moyen des phases mobiles 2 et 6 , on remarque la présence des taches 1, 3, 4 et 5 et l'absence de la tache 2, aucune tache nouvelle n'étant présente.

V. 2. 3. Mutinus caninus et Clathrus ruber.

Le léger dépôt obtenu dans le flacon IV pour ces deux champignons a également été essoré, lavé, séché et dissous dans l'acétate d'éthyle. L'analyse en ccm avec les phases mobiles 2 et 6 a montré la présence d'une seule tache, à savoir celle qui correspond à la DNPH non transformée (cf fig. 39).

Fig. 39. ccm de C_{41} et D_{41}.

Phase stat.: GF_{254}, 0.25 mm
Phase mob. : 2 et 6 respect^{t}.
Temp. : ordinaire
Sat. : buvard
Front : 15 cm
Dépôt : 1 µl sol.AcOEt 1%
Témoin : DNPH pure.

On ne peut cependant déduire de ce résultat l'absence pure et simple de composés carbonylés dans l'odeur de ces deux Gastéromycètes, ceci à cause du petit nombre d'échantillons à disposition, et cette question reste ici en suspens.

VI. RECHERCHE D'AUTRES COMPOSES DANS L'ODEUR DE PHALLUS IMP. ET ANTHURUS ARCH.

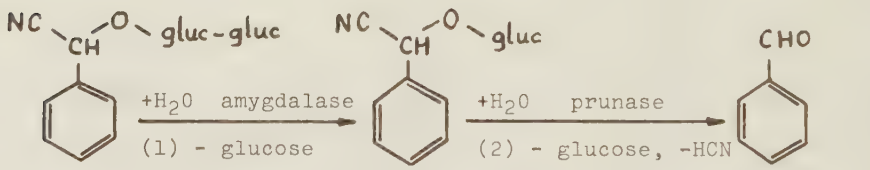
VI. 1. Recherche de HCN dans Phallus imp.

VI. 1. 1. Hypothèse.

Nous avions trouvé (V.2.1.1.) le benzaldéhyde dans les constituants de l'odeur des chapeaux de Phallus impudicus. Or, sa provenance pourrait s'expliquer par l'hydrolyse d'un cyanoglucoside dans ces organes.

En effet, trois de ces composés, scindés par l'émulsine, donnent le benzaldéhyde à côté d'autres produits de réaction. Ce sont:

a) l'amygdaloside.



amygdaloside prunaside benzaldéhyde

(amygdalase + prunase = émulsine)

b) le prunaside: cf. réaction 2 ci-dessus.

c) le prulauraside: stéréoisomère du prunaside et hydrolysé comme ce dernier (31).

A côté du benzaldéhyde, nous trouvons donc dans les trois cas le glucose et l'acide cyanhydrique dans les produits de l'hydrolyse.

Or, le glucose a été identifié dans la glèba de Phallus imp. par Rathay et Haas (32) en 1883 déjà. Quant à l'émulsine, il y a déjà longtemps que G. Klein (33) en a signalé la présence dans notre champignon. Il devenait dès lors intéressant de voir si de l'acide cyanhydrique se dégageait également de son chapeau.

VI. 1. 2. Essais préliminaires.

Afin de ne pas trop allonger cette partie, nous ne citerons chaque fois que le principe et le résultat de ces essais. Le détail de l'exécution sera donné dans la partie expérimentale.

VI. 1. 2. 1. Suspension de AgI (34).

Le gaz à examiner est conduit dans une fine suspension d'iodure d'argent dans l'hydroxyde de potassium aqueux à 5% : la disparition de l'opalescence indique un résultat positif. Cette réaction (formation de ICN soluble) est spécifique.

Plusieurs essais, conduits avec un échantillon de 15 chapeaux de Phallus, avec des suspensions de AgI allant de la quantité indiquée dans la litérature jusqu'à une quantité cinq fois supérieure, ont donné un résultat positif en l'espace de moins de 15 heures.

Les essais à blanc, quant à eux, ne donnent un résultat approchant qu'après une durée de 6 jours, et ceci à cause d'un autre effet, d'ordre physique (cf partie expérimentale).

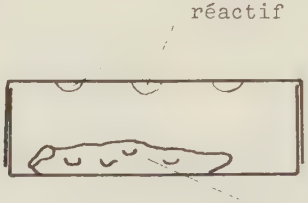
VI. 1. 2. 2. Recherche de HCN selon Schönbein (35).

Cet essai, non spécifique, est basé sur la coloration en bleu du papier de guaîac par HCN (entre autres). On place 1 - 2 chapeaux de Phallus au fond d'un flacon erlenmeyer, indroduit une bande de papier imbibée de réactif que l'on coince avec le bouchon. La limite de détection se situe vers 10^{-6} g HCN.

Du fait de son manque de spécificité, ce test positif (fugitive coloration bleu-ciel) ne peut être considéré que comme une indication parmi d'autres. Un essai à blanc, sans chapeaux de Phallus, est resté négatif.

VI. 1. 2. 3. Recherche de HCN selon Brunswick (36).

Fig. 40.



Réactifs:

a) selon Brunswick:
solution de $AgNO_3$ colorée au bleu de méthylène,

b) selon Malitzky et Koslowsky (37):
solution de $AgNO_3$ colorée au bleu de méthylène et additionnée d'acide nitrique.

L'essai est ici basé sur la formation d'un précipité de AgCN dans les gouttes de réactif en cas de présence de HCN (fig.40). La limite de détection est de $6 \cdot 10^{-8}$ g HCN. Dans le cas du réactif b, les cristaux sont nettement colorés en bleu-vert. Repris par HNO_3 à 40%, ils doivent donner, après chauffage et refroidissement, de petits amas de cristaux en aiguilles.

Les essais à blanc, avec boîte de Petri vide et quelques gouttes des deux réactifs, donnent un résultat négatif. Si l'essai est effectué en plaçant des fragments de chapeaux de Phallus dans la boîte, par contre, il donne un résultat très nettement positif pour les deux réactifs.

* * *

Au vu des résultats de ces essais préliminaires, dont la limite de détection se situe autour de 10^{-6} à 10^{-8} g de HCN, une analyse plus fine semblait indispensable.

C'est par notre système de captage classique que cette possibilité allait nous être offerte. En effet, il apparaissait clairement que HCN, en admettant qu'il soit présent dans l'odeur du champignon, devait traverser sans être retenu les solutions des flacons I et II, toutes deux acides. Le flacon III, contenant $HgCl_2$ en solution, devrait pourtant retenir cette substance en la fixant de la manière suivante:

$$HgCl_2 + 2\,HCN \longrightarrow Hg(CN)_2 + 2\,HCl$$

HCN sera donc en partie bloqué dans ce flacon sous forme de cyanure. Or, Rosenthaler (39) fonde précisément sa recherche de HCN sur ce principe, la seule différence résidant dans le fait qu'il utilise une solution de sublimé à 1% pour capter le HCN provenant du végétal à étudier. A part son utilité dans l'analyse des thiols, le flacon III servira donc également à la détermination de l'acide cyanhydrique.

VI. 1. 3. Détermination de HCN selon Rosenthaler.

La solution de chlorure mercurique contenant le HCN présumé est divisé en deux fractions examinées comme dans la fig. 41.

1ère fraction: elle est soumise à la réaction du rhodanate. Le cyanure mercurique est transformé en thiocyanate par le polysulfure de calcium, puis déterminé par le Fe^{3+}.

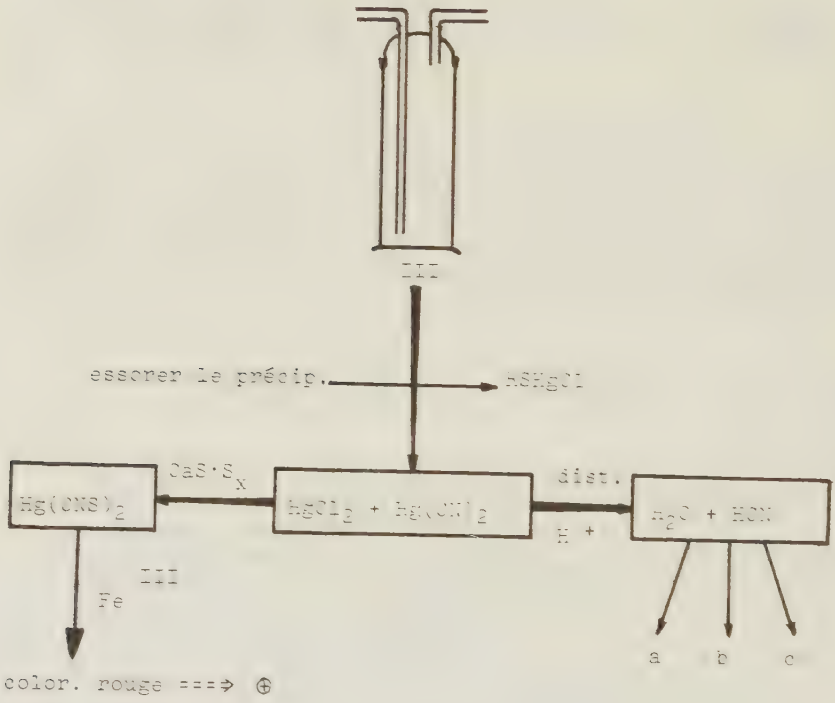
2ème fraction: on la distille en milieu acide et reçoit le distillat dans un peu d'eau. Celui-ci est alors soumis à trois tests:

a) phénolphtaline,
b) décoloration d'une solution iodo-amidonnée,
c) clarification d'une suspension ammoniacale de AgI.

On considère la détermination de HCN comme effective si, en dehors, de la réaction du rhodanate, une des réactions a) à c) donne un résultat positif.

En pratique, nous avons procédé à quatre essais.

Fig. 41. Recherche de CN^- dans le flacon III.



VI. 3. 1. Essai à blanc.

50 ml d'une solution de $HgCl_2$ p.a. à 5%, soumis à la réaction du rhodanate, donnent un résultat négatif.

VI. 1. 3. 2. Essai avec 14 mg de $Hg(CN)_2$.

Ces 14 mg de cyanure mercurique, dissous dans 40 ml d'une solution de chlorure mercurique à 5% et correspondant à une quantité de 3 mg de HCN libre donnent une réaction du rhodanate fortement positive (coloration rouge sang persistante).

VI. 1. 3. 3. Essai avec 1.4 mg de $Hg(CN)_2$.

La correspondance est de 300 µg de HCN libre, et la réaction du rhodanate donne ici aussi un résultat positif.

VI. 1. 3. 4. Essai sur un échantillon de chapeaux de Phallus.

L'odeur de 115 chapeaux de Phallus (environ 1500 g) a été fixée dans notre système de captage, le flacon III contenant 100 ml de solution de $HgCl_2$ à 5%. Après essorage du précipité de RSHgCl, le filtrat a été divisé en deux parties, analysées selon le procédé de Rosenthaler: la 1ère partie a donné une réaction du rhodanate nettement positive, un peu plus faible que celle de l'essai VI.1.3.3.

La 2ème partie a été distillée en milieu acide et les 52 ml de distillat obtenus divisés en 3 parties soumises aux tests cités plus haut:

a) réaction de la phénolphtaline: +

b) réaction de la solution iodo-amidonnée: +

c) réaction de la suspension de AgI: non effectuée.

VI. 1. 4. Conclusion.

Sur la foi de cette série d'examens, nous pouvons dire que notre hypothèse de la présence de HCN dans l'odeur du chapeau de Phallus imp. est confirmée. Du point de vue quantitatif, nous n'avons cependant que peu d'indications, mais en considérant la consommation de AgI dans l'essai VI.1.2.1., nous pouvons estimer que 15 chapeaux ont dégagé en 15 heures 14.5 µg de HCN au moins, soit 1 µg de HCN par chapeau.

VI. 2. Recherche de l'amygdaloside dans Phallus imp.

La présence de l'acide cyanhydrique et du benzaldéhyde dans le chapeau du champignon permet d'envisager également celle d'un cyanoglucoside. Nous n'avons d'abord pensé qu'à l'amygdaloside, le traité consulté (31) ne mentionnant la présence du prunaside et du prulauraside que dans la famille des rosacées.

La recherche de l'amygdaloside a été effectuée sur un échantillon de 1450 g d'oeufs de Phallus (champignon encore enfermé dans son péridium et ne présentant pas d'odeur spéciale). Les jeunes chapeaux ont été délicatement dégagés du reste du champignon et extraits immédiatement à chaud par l'éthanol. Une précipitation fractionnée des sucres par l'éther a été faite après évaporation de l'extrait à 1/10 environ. Les trois fractions cristallines obtenues ont été analysées en ccm avec les phases mobiles 7 et 8, proposées par Stahl pour la séparation des glucides. Dans les deux cas, la séparation de l'amygdaloside d'avec les glucides a été parfaite, mais aucune tache des échantillons 1 - 3 ne correspond avec celle du cyanoglucoside (fig. 42).

On peut difficilement admettre que l'amygdaloside ait été détruit pendant l'extraction à l'alcool, car aucune odeur de benzaldéhyde n'a été perçue pendant cette opération. HCN et le benzaldéhyde proviennent-ils dès lors d'un autre cyanoglucoside, voire de composés différents ? Pour l'instant, cette question reste posée.

Fig. 42. Recherche des cyanoglucosides par ccm.

Phase stat. : cf partie pratique (VI 2)
Phase mob. : 7 et 8 respect^{t}.
Temp. : ordinaire
Sat. : buvard
Front : 10 cm
Témoins : 1 µl sol.aq. 1% de

a) amygdaloside
b) mannose
c) glucose
d) galactose

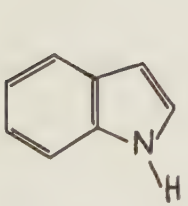
Révélation : cf partie pratique (VI 2)

VI. 3. Composés indoliques dans l'odeur de Phallus impudicus et Anthurus archeri.

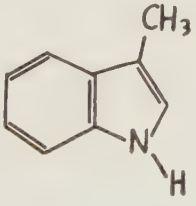
L'odeur de Phallus impudicus varie considérablement avec deux facteurs:

a) l'éloignement du végétal à l'observateur,
b) l'âge du champignon.

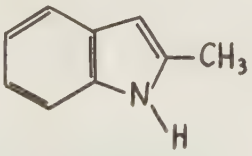
On constate par exemple que dans un premier stade (champignon fraîchement sorti de l'oeuf et âgé de moins de six heures environ), la tige présente une odeur très fraîche et fleurie, perceptible à faible distance du champignon seulement, et qui n'a sans doute rien à voir avec l'odeur "fétide et repoussante" des traités de mycologie. Un chimiste en parfum ayant déclaré qu'elle lui rappelait exactement celle du jasmin, nous nous sommes demandé si l'odeur de Phallus ne pouvait, comme celle de cette oléacée, contenir des substances indoliques. Otto Hilber (41), en 1968, a d'ailleurs trouvé trois de ces composés dans des extraits à l'acétate d'éthyle de plusieurs espèces de tricholomes et d'une lépiote:



indole



scatole ou 3-Me-indole



2-méthylindole

Un essai d'orientation avec 300 g de jeunes tiges de Phallus extraites à l'alcool pendant plusieurs jours a alors été fait. L'extrait, évaporé jusqu'à un stade de résine est agité avec 10 ml d'éthanol que l'on soumet ensuite à la réaction d'Ehrlich (42), dont la limite de détection est de 10^{-6} g pour l'indole et de 10^{-5} g pour le scatole. Celle-ci étant nettement positive, nous désirions préciser ce résultat. Abandonnant cette fois notre système de captage des odeurs, nous avons appliqué la méthode préconisée par Hilber, en lui apportant pourtant quelques modifications, car si nous avons également utilisé la ccm pour l'analyse des extraits de champignons à l'acétate d'éthyle, nous avons ensuite

préféré la chromatographie en phase gaceuse à celle sur papier pour vérifier les résultats de la ccm.

Trois échantillons ont été extraits à l'acétate d'éthyle:

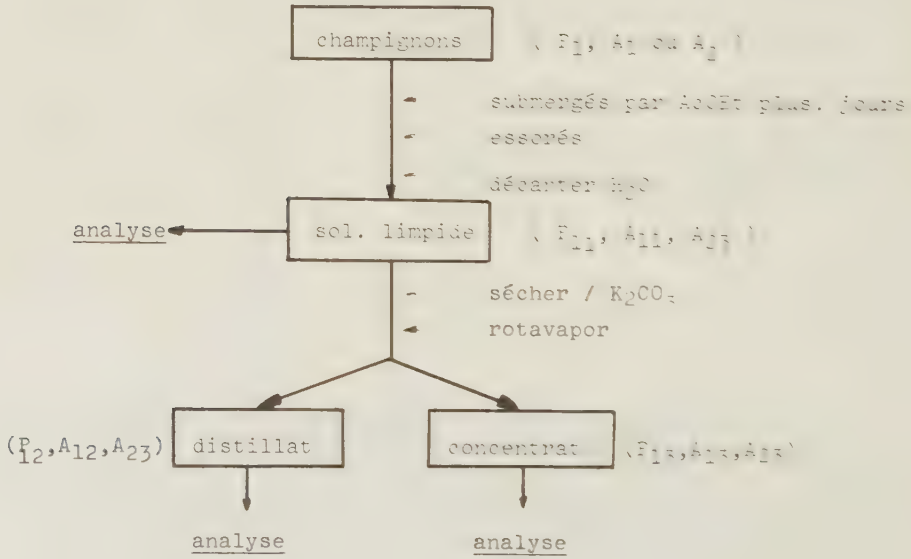
P_1 : 228 gr de jeunes tiges de Phallus,

A_1 : 250 gr de jeunes Anthurus (1 à 10 heures après sortie de "l'oeuf"),

A_2 : 400 gr d'Anthurus épuisés (après captage de leur odeur, c'est-à-dire âgés de 3 - 4 jours) .

Ces extraits, notés P_{11}, A_{11} et A_{21} (fig. 43), possèdent bien l'odeur caractéristique des champignons, soit fraîche et fleurie pour P_{11}, odeur d'excréments pour A_{11}, et odeur d'excréments et de pourriture pour A_{21}.

Fig. 43. Extraction des composés indoliques.



VI. 3. 1. Analyse par ccm.

VI. 3. 1. 1. Selon Hilber, lui-même d'après Kaldewey (43).

On pose des taches de 25 à 50 µl d'extrait et de 1 µl des témoins en solution AcOEt à 1%. Après développement avec la phase mobile 9, on révèle avec le réactif d'Ehrlich pour constater, dans notre cas, qu'aucune tache de l'extrait ne correspond avec celles des témoins (fig. 44).

Après séchage sur K_2CO_3, nos extraits sont alors concentrés dans l'évaporateur rotatif et nous obtenons d'une part les distillats (P_{12}, A_{12} et A_{22}: faible odeur des champignons) et d'autre part les concentrats (P_{13}, A_{13} et A_{23}: très forte odeur des différents champignons). L'examen de ces échantillons par ccm donne le résultat suivant:

P_{12} :

A_{12} : aucune tache visible après révélation (fig. 44).

A_{22} :

P_{13} : plusieurs taches mauves à violettes, dont une a le même hRf (0.81) et la même coloration que celle de l'indole témoin.

A_{13} : Plusieurs taches mauves à violettes, dont une correspond à l'indole et une autre au scatole (hRf = 0.87).

A_{23} : traînée mauve-violette avec plusieurs taches sur toute la longueur du parcours (fig. 44).

Avant de préciser ce résultat par une deuxième ccm, nous pouvons remarquer que la note dominante de l'odeur est conservée lors des diverses opérations (champignon-extrait initial-extrait concentré-distillat).

VI. 3. 1. 2. ccm avec le phase mobile 2.

Nous avions utilisé cette dernière pour l'analyse des DNPHones et ne l'avons pas trouvé dans la littérature pour celle des composés indoliques simples.

Cependant la séparation de l'indole et du scatole (hRf 0.31 et 0.39 respectivement) est assez bonne pour que nous puissions l'utiliser dans ce but. Le résultat (fig. 45) est le suivant:

P_{13} : une tache correspondant exactement à celle de l'indole (rose).

A_{13} : deux taches correspondant exactement à celles de l'indole et du scatole.

A_{23} : pas de taches au niveau des témoins.

Sur la foi de l'analyse par ccm nous pouvons donc déjà constater avec une certaine certitude (deux phases mobiles différentes et couleur après révélation) que si l'indole semble présent dans la tige fraîche de Phallus et l'indole et le scatole dans l'Anthurus frais, ces deux composés ne se trouvent plus dans l'Anthurus épuisé en quantité décelable par notre méthode. Nous désirions finalement assurer ce résultat par une analyse de nos extraits en GC.

VI. 3. 2. Examen par GC.

Nous avons porté notre choix sur une colonne apolaire: SE 30 à 15% sur du chromosorb G/AW, dans une colonne en verre de 7 pieds par 2 mm Ø int. En opérant à 150 °C avec un débit d'azote de 20 ml/min , on obtient un temps de rétention de 16.4 min pour l'indole et 25.2 min pour le scatole (non-corrigés par rapport au pic du solvant:AcOEt).

Le chromatogramme de P_{13} confirme le résultat des ccm, avec un pic au temps de rétention de l'indole sans pic correspondant à celui du scatole (fig. 46). Il en est de même pour A_{13}, où un signal correspond à celui de l'indole et un autre (environ 15% du premier) à celui du scatole (fig. 47). Pas de pics nets, par contre, pour A_{23}, ce qui correspond bien aux résultats obtenus en ccm.

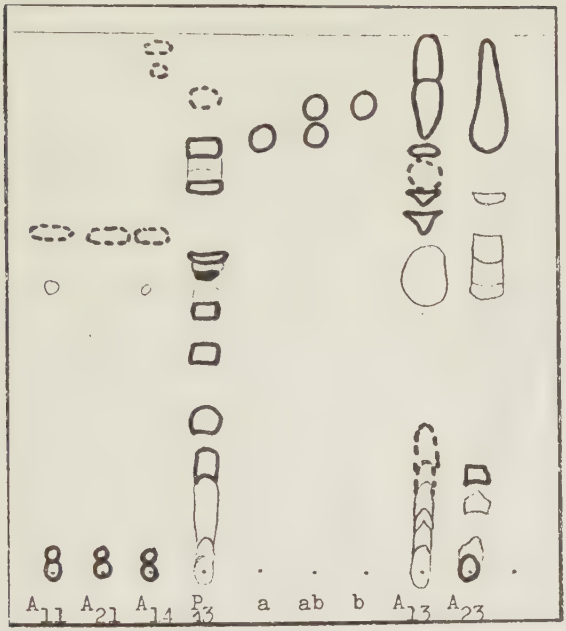


Fig. 44. Recherche de composés indoliques par ccm..

Phase stat.: G, 0.25 mm
Phase mob. : 9
Temp. : ordinaire
Sat. : buvard
Front : 10 cm
Dépôt : 30 à 60 µl pour les extraits et 1 µl sol. AcOEt 1 o/oo pour les témoins.
Témoins : a) indole
b) scatole
Révélation : réactif de Ehrlich.

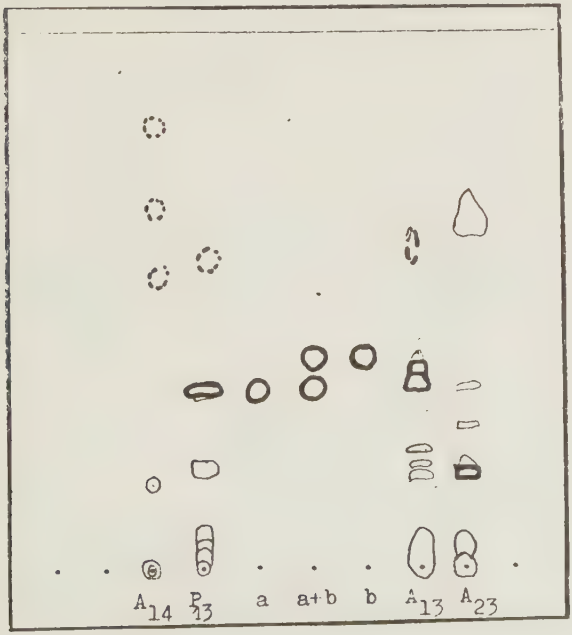


Fig. 45. Recherche de composés indoliques par ccm .

Conditions identiques à fig. 39, sauf le front (15 cm) et la phase mobile (2). Comme ci-dessus, les taches dessinées en gras sont celles donnant une coloration mauve à bleue avec le réactif de Ehrlich.

Fig. 46. GC de l'extrait des tiges de Phallus à l'AcOEt.

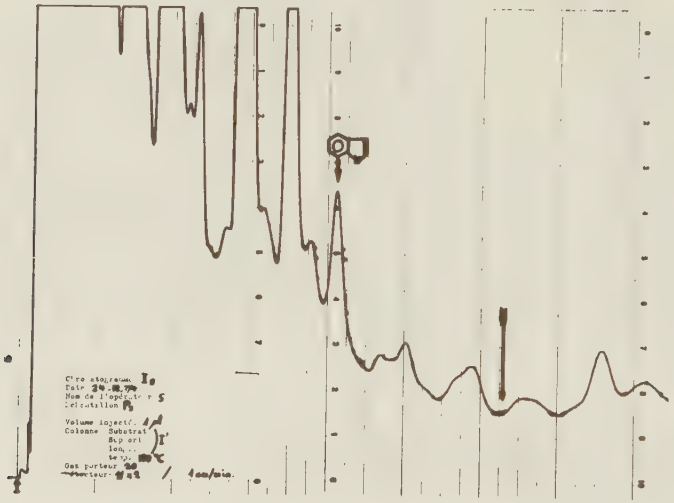
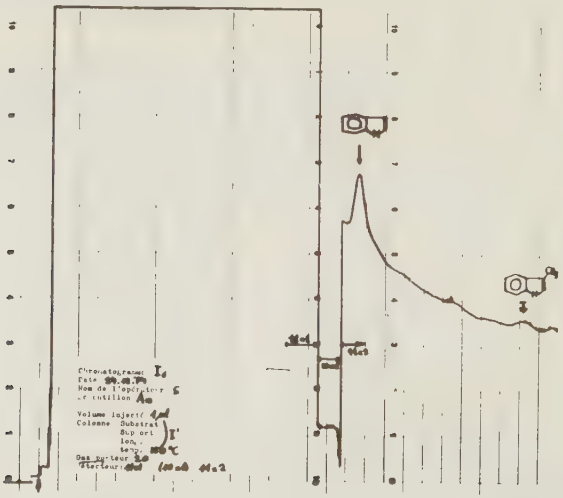


Fig. 47. GC de l'extrait de Anthurus arch. à l'AcOEt.



VI. 3. 3. Estimation des concentrations.

Elle est très grossière en ccm, où nous la faisons simplement par comparaison entre la coloration des taches révélées de l'échantillon et du témoin à différentes dilutions, mais un peu plus fine en GC, où une mesure approximative de la surface des pics est possible.

Ech.	Vol.	Indole ccm	Indole GC	Scatole ccm	Scatole GC
P_{13}	1.5 ml	0.005%	0.009%	0.000%	0.000%
A_{13}	6 ml	0.005%	0.005%	?	0.0007%
A_{23}	1.4 ml	0.000%	?	0.000%	?

En tenant compte du volume des échantillons, nous obtenons:

- entre 75 µg (ccm) et 135 µg (GC) d'indole pour 228 g de tiges fraîches de Phallus,
- environ 300 µg (ccm et GC) d'indole et 45 µg de scatole (GC) pour 250 g d'Anthurus frais.

Il faut cependant être bien conscient que ces valeurs n'indiquent qu'un ordre de grandeur, d'autant plus que nous n'avons sans doute extrait que l'indole et le scatole présents au moment de l'opération, mais ni avant (déjà volatilisés), ni après (non encore libérés).

DISCUSSION

Nous commencerons par présenter, sous forme de divers tableaux, les résultats obtenus dans ce travail.

Tableau 4 Phallus impudicus.

composé	localisation	méthode analytique	particularités
amines	tige et chapeau	voir ci-dessous	dégagement très faible au début, augmentant fort dès les 2e et 3e jour. Environ 1800 mg chlorhydrates pour 80 tiges en 72 h.
NH_3	tige et chapeau	GC NH_3 libre NH_4Cl (ccm) DNBA (ccm,PF,IR) DNA (ccm)	93 % des chlorhydrates totaux.
CH_3NH_2	chapeau	DNBA (ccm)	traces
$(CH_3)_2NH$	tige et chapeau	GC amine libre DNBA (ccm) DNA (ccm)	traces
β-phényl-éthylamine	chapeau	DNBA (ccm)	traces
triméthyl-amine	tige et chapeau	GC amine libre	7% des chlorhydrates totaux.
H_2S	tige et chapeau, mais pas de glèba	Précipité PbS: 3.1 mg pour 50 tiges et 8.2 mg pour 50 chapeaux de 0 à 72 h.	le dégagement est maximum le 1er jour, puis devient très faible.
CH_3SH	tige et chapeau	GC du thiol libre CH_3SHgCl (IR) CH_3-DNPTE (ccm, PF et IR)	973 mg CH_3SHgCl pour 50 tiges et 443 mg pour 50 chapeaux de 0 à 72 h. Dégagement max. le 1er jour, nul dès le 3e jour.

Tableau 4 Phallus impudicus. (suite)

composé	localisation	méthode analytique	particularités
composés carbonylés	chapeau uniquement	DNPHones et GC	- 381 mg DNPHones pour 58 chapeaux. - 195 mg DNPHones pour 23 chapeaux.
CH_3CHO	glèba et carcasse	GC aldéhyde libre DNPHone (ccm, PF, PF mixte, IR).	sa production commence le 1er jour dans la carcasse, le 2e jour seulement dans la glèba.
benzaldéhyde	glèba et carcasse	GC aldéhyde libre DNPHone (ccm, PF et IR)	sa production est forte dès le début et cesse après 80 h.
Subst. 2 (=cinna-mald.?)	carcasse uniquement	DNPHone (ccm, PF)	dès le 1er jour.
HCN	Chapeau	-tests micro -détermin. sous fme CNS^- selon Rosenthaler	au moins 14.5 mg pour 15 chapeaux en 15 h.
indole	tige	GC indole libre et ccm indole libre.	de 75 à 135 mg dans 20 tiges fraîches.

Tableau 5 Anthurus archeri.

composé	méthode analytique	particularités
amines	voir ci-dessous	mêmes remarques que pour Phallus; environ 1391 mg de chlorhydrates pour 71 Anthurus en 72 h.
NH_3	GC NH_3 libre NH_4Cl (ccm) DNBA (ccm, PF, IR)	~ 94% des chlorhydrates totaux.
$(CH_3)_2NH$	GC amine libre DNBA (ccm)	traces.
$(CH_3)_3N$	GC amine libre	~ 6% des chlorhydrates totaux.
H_2S	précipité PbS: environ 6 mg pour 50 Anthurus en 72 h.	comme pour Phallus, dégagement max. le 1er jour, puis très faible.
CH_3SH	GC thiol libre CH_3SHgCl (IR) CH_3-DNPTE (ccm)	environ 84 mg CH_3SHgCl pour 35 Anthurus en 72 h.
composés carbonylés	DNPHones	- 13 mg DNPHones pour 40 Anthurus, - environ 36 mg DNPHones pour 90 Anthurus en 72 h.
HCHO	ccm,PF,PF mixte et IR	
CH_3CHO	ccm,PF,PF mixte et IR	
subst. 1 = phénylacétaldéhyde ?	ccm	
subst. 3 = benzaldéhyde ?	ccm	
indole	GC et ccm indole libre	environ 300 mg pour 18 Anthurus frais & absent dans les Anthurus âgés.
scatole	GC et ccm indole libre	environ 45 mg pour 18 Anthurus jeunes & absent

Tableau 6 Mutinus caninus et Clathrus ruber.

composé	champignon	déterm. et particularités
amines	Mutinus	environ 37 mg de chlorhydrates pour 7 champignons en 72 h.
	Clathrus	environ 11 mg de chlorhydrates pour 4 champignons en 72 h.
NH_3	Mutinus	DNBA (ccm,PF,PF mixte et IR)
	Clathrus	GC amine libre
triméthyl-amine	Mutinus et Clathrus	GC amine libre
n-propyl - amine ?	Clathrus	GC amine libre
H_2S	Mutinus et Clathrus	précipité de PbS
CH_3SH ?	Mutinus et Caninus	précipité de RSHgCl

Pour Phallus impudicus, la comparaison de nos travaux avec ceux des chercheurs allemands est intéressante. Au chapitre des amines, nous ne nous étonnerons pas des différences entre les résultats obtenus pas List et Reinhard et les nôtres. Rien ne permet en effet d'affirmer que les "amines volatiles" que ces auteurs ont isolées dans un extrait à l'alcool de l'oeuf (inodore) de Phallus se trouvent effectivement dans l'odeur du champignon mûr. Pour ce qui est de l'acide sulfhydrique et du méthanethiol, nos travaux corroborent ceux de List et Freund, qui ont extrait ces deux composés du chapeau de Phallus en 1967. Nous avons de plus pu montrer leur présence dans l'odeur de la tige du champignon.

Du côté des composés carbonylés, nous avons pu constater l'absence des formaldéhyde, phénylacétaldéhyde, α-phénylcrotonaldéhyde et de la dihydrochalcone dans l'odeur des chapeaux de nos Phallus. Cette constatation est d'autant plus étonnante que List et Freund ont isolé les trois premières substances par une méthode douce (lyophilisation), peu susceptible de former des artéfacts. De plus, ces auteurs n'ont mis en évidence ni le benzaldéhyde, ni l'éventuel cinnamaldéhyde. Dans l'immédiat, nous ne pouvons proposer que deux hypothèses pour tenter d'expliquer ces différences:

a) nous nous trouvons en présence de deux variétés climatiques différentes de Phallus imp.,

b) la nature du milieu vital des champignons (en particulier la composition du sol) peut avoir une influence sur la composition chimique de leur odeur. Nous remarquons en effet que si nos exemplaires ont été récoltés dans des bois de conifères (épicéa), ceux des auteurs allemands provenaient de sous-bois de feuillus.

A côté de l'identification elle-même des constituants de l'odeur, un résultat intéressant de ce travail a été la constatation que ceux-ci peuvent être classés, selon leur dégagement, en deux catégories. En effet, si pour certains d'entre eux le dégagement commence dès le début de la vie aérienne du champignon (benzaldéhyde, HCN, méthanethiol, indole, scatole) pour cesser après deux ou trois jours, il ne se manifeste pour d'autres qu'après un certain laps de temps, pour ensuite augmenter avec le vieillissement du champignon (ammoniac, amines, acétaldéhyde).

Cette différence est sans aucun doute à mettre en relation avec la distinction entre métabolites primaires et secondaires. Sans vouloir parler ici du rôle des métabolites secondaires dans le métabolisme général des organismes vivants - rôle discuté par divers auteurs (48) - nous nous bornerons à rappeler que ceux-ci, contrairement aux métabolites primaires, ne participent pas de façon vitale à l'économie de l'organisme. Ils ne sont donc pas communs, dans les végétaux, à la plupart des espèces, mais se rencontrent çà et là, de façon assez spécifique. C'est le cas, par exemple, de la majorité des pigments, des constituants des huiles essentielles, des toxines, etc.

Il va sans dire que l'ammoniac, les amines et l'acétaldéhyde, catabolites normaux des protéines et dont le dégagement augmente proportionellement à l'âge du champignon, représentent des métabolites primaires, contrairement au benzaldéhyde, à l'acide cyanhydrique, au méthanethiol et aux composés indoliques, dont le dégagement commence dès la rupture du péridium pour cesser après quelque temps et qui sont, de plus, spécifiques à un nombre restreint de végétaux.

Pour ce qui est de la raison de la puissante odeur des Phallales, nous n'essayerons pas de proposer ici une réponse unique. En effet, s'il semble prouvé que Phallus imp. attire certains insectes coprophiles pouvant participer à la propagation de l'espèce, nous n'avons jamais pu constater, en cinq ans de récoltes, la présence de pareils agents sur Anthurus archeri. Remarquons qu'il est fort possible que si le champignon s'est, à l'origine, propagé à l'aide de tels insectes en Australie et N1le Zélande, ceux-ci ne vivent pas actuellement sous nos latitudes. Il nous a paru frappant que la plus grande densité de ces champignons s' est rencontrée sur les chemins forestiers et dans les clairières provoquées par de récentes coupes de bois, donc dans des endroits abondamment foulés. Il est ainsi probable que la propagation de l'espèce se fasse dans nos régions essentiellement par l' homme et les gros animaux. N' est-ce pas d'ailleurs ainsi que ce champignon a pris pied sur notre continent ?

RESUME

Le présent travail porte sur l'étude des constituants de l'odeur de quatre Gastéromycètes: Phallus impudicus L, Anthurus archeri E. Fisch, Mutinus caninus Fr, et Clathrus ruber Mich.

Par un procédé d'enfleurage, cette odeur a pu être enrichie et ses constituants séparés en divers groupes chimiques. Leur séparation et identification ont donné les résultats suivants:

Phallus impudicus: ammoniac, triméthylamine, H_2S, méthanethiol, acétaldéhyde, benzaldéhyde, HCN, indole, de même que des traces de méthylamine, diméthylamine, phényléthylamine et d'un aldéhyde pouvant être le cinnamaldéhyde.

Anthurus archeri : ammoniac, triméthylamine, H_2S, méthanethiol, formaldéhyde, acétaldéhyde, indole, scatole, de même que des traces de diméthylamine et de deux aldéhydes pouvant être le phénylacétaldéhyde et le benzaldéhyde.

Mutinus caninus : ammoniac, triméthylamine, H_2S; le méthanethiol est sans doute présent.

Clathrus ruber : ammoniac, triméthylamine, propylamine, H_2S; là aussi, le méthanethiol est sans doute présent.

Pour Phallus imp. des constatations importantes ont pu être faites sur la localisation du dégagement de l'odeur.

La séparation des constituants de l'odeur en métabolites primaires et secondaires a été tentée sur la base de leur présence plus ou moins spécifique dans nos champignons et de l'instant de leur dégagement au cours de la vie des champignons.

* * *

C. Partie expérimentale

I. GENERALITES.

I. 1. Récolte des champignons.

Phallus impudicus a été reccueilli au cours des étés 1971 à 1975 dans trois endroits différents dans le canton de Vaud, en Suisse: le bois de Pampigny,celui de Cossonay et le parc de l'école polytechnique fédérale de Lausanne,essentiellement sous conifère.Le poids moyen de nos exemplaires était d'environ 100 g,la tige représentant les 20% du total,le chapeau les 18, et la "volve" les 62% restants.

Anthurus archeri provient d'une chênaie à charme de 16000 ha: la forêt domaniale de la Chaux, en Franche-Compté (France), où il a été cherché en 1971,puis de 1973 à 1975. Le poids moyen était de 14 g, l'ensemble réceptacle-glèbe représentant les 70% et la "volve" les 30% du total.

Clathrus ruber a été ramené de Grèce par le Prof. Girardet en août 1973. Quant à Mutinus caninus,il nous a été envoyé du Tessin par le Dr. Römer,pharmacien à Caslano *,au cours de l'automne 1973.

Sitôt ramenés,les champignons,à l'état d'"oeufs", sont placés sur du coton hydrophile humide et recouverts de béchers. On aére de temps en temps en soulevant ces derniers et l'épanouissement du carpophore se produit ainsi en général entre le premier et le six ou septième jour.

I. 2. Système de captage.

Les champignons sont placés dans des tubes en verre de 35 cm de long par 4,5 cm de diamètre.L'air humidifié par barbotage dans l'eau et parcourant ces tubes est celui que la firme Carba qualifie de "respiratoire"; son débit est d'environ 10 ml par minute,ce qui correspond approximativement à 1 bulle par seconde dans un flacon laveur standard .

*Nous tenons à remercier ici le Dr. Elvezio Römer pour l'envoi de plusieurs exemplaires de Mutinus caninus à l'état jeune (enfermés dans leur péridium).

Les champignons, sauf cas mentionnés, restent dans le système jusqu'à ce que l'on remarque de nets signes de vieillissement, qui se manifestent essentiellement par une perte de turgescence, une forte perte d'eau et surtout une modification radicale de l'odeur (apparition d'une odeur de pourriture).

Solutions dans les divers flacons:

I. HCl 2-n p.a.

II. $Pb(OAc)_2$ 0,5-n dans l'eau acidulée par AcOH.

III. $HgCl_2$ à 5% dans l'eau.

IV. Solution de 2.0 g de 2,4-dinitrophénylhydrazine p.a. dans 20 ml d'acide sulfurique conc. et complétée à 100 ml avec de l'eau.

I. 3. Autres généralités.

Les spectres infrarouge des substances dans le KBr ont été obtenus au moyen du spectroscope à prisme Perkin-Elmer modèle 177, et les spectres de RMN au moyen de l'appareil A-60 de la firme Varian.

Les analyses élémentaires ont été effectuées par le Mikrolabor de l'institut de chimie analytique de l'école polytechnique fédérale à Zürich.

Les points de fusion ont été déterminés avec un microscope à platine chauffante de la firme Suter (Bâle) et l'appareil à points de fusion modèle Mark I de la firme Electrothermal Engeneering Ltd.

L'éther utilisé a été séché, débarrassé de ses peroxydes et distillé sur Na métallique.

L'éthanol "pour analyse" de la firme Merck employé dans le travail avec les substances carbonylées a été chauffé à reflux pendant 4 heures avec de la 2,4-dinitrophénylhydrazine et de l'acide sulfurique, puis distillé.

I. 4. La ccm.

Préparation des plaques analytiques:

30 g de gel de silice G ou GF_{254} de la firme Merck sont suspendus dans 60 ml d'eau, agités pendant 90 secondes et étendus avec l'appareil de revêtement Camag sur 5 plaques de 20/20 cm . Après séchage à l'air,les plaques sont activées 30 minutes à 105 °C.

Préparation des plaques préparatives:

On procède de même,en partant de 90 g de gel de silice et de 180 ml d'eau.L'épaisseur de la couche est de 1 mm et l'activation à 105 °C. se fait pendant 60 minutes.La solution contenant les substances à séparer est déposée sous forme d'une bande mince à 2,5 cm du bord inférieur de la plaque au moyen de l'appareil "Chromatocharger" de la firme Camag.

Phases mobiles:(tous les chiffres s'entendent en volumes)

1: chloroforme/éthanol (99+1)

2: cyclohexane/chloroforme/acétate d'éthyle (70+20+10)

3: méthanol

4: phase sup.de: n-butanol/acide acétique/eau (40+10+50)

5: phénol/eau (80+30)

6: tétrachlorure de carbone/cyclohexane/acétate d'éthyle (100+20+5)

7: n-propanol/eau (85+15)

8: acétone/eau (90+10)

9: chloroforme/acide acétique (95+5)

La saturation des cuves a été faite au moyen du papier buvard imprégné de la phase mobile pendant au moins une heure avant le développement.

Dans le cas où plusieurs développements ont été nécessaires, les plaques ont été soigneusement séchées entre chaque opération sous courant d'air à température ordinaire.

I. 5. La GC.

Nous nous sommes servi d'un chromatographe Varian modèle 1440 à une colonne avec détecteur FID. Gaz vecteur: N_2 (20 ml/min.). Colonne: verre 2 pieds par 2 mm de diamètre intérieur, remplie avec de la silicone SF 30 à 1% sur du Chromosorb G/AW (technique de l'évaporateur rotatif). Pour l'injection de nos échantillons, nous avons utilisé trois méthodes différentes:

a) "head space analysis" de l'odeur à un moment donné: le matériel vivant est enfermé dans une enceinte en verre de taille légèrement supérieure une heure avant l'injection. Passé ce délai, on prélève 5 ml de l'atmosphère de l'enceinte au moyen d'une seringue à gaz et injecte ce volume directement dans la colonne.

b) "head space analysis" d'une fraction de l'odeur: deux cas se présentent ici. Pour l'analyse des amines, on dissout leurs chlorhydrates dans un peu d'eau et place cette solution dans un "snap-cap" de 20 ml. On alcalinise ensuite par NaOH 5-n, et après avoir laissé l'équilibre s'établir pendant une heure à flacon fermé, on prélève 5 ml de l'atmosphère du "snap-cap" et procède comme pour a).
Pour l'analyse des thiols, on procède inversement en plaçant la solution de KOH contenant les thiols en solution dans le "snap-cap" et en acidifiant par H_2SO_4 50%. La suite des opérations est analogue.

c) injection classique de 1 µl d'une solution directement dans la colonne (analyse des composés indoliques par exemple).

II. ANALYSE DES AMINES.

II. 1. Synthèse des 3,5-dinitrobenzamides.

Pour les dérivés de référence, dissoudre 200 mg du chlorhydrate de l'amine dans 50 ml d'eau. Ajouter une solution de 3,5-dinitrobenzoyle dans 150 ml d'éther "pour narcose".
Ajouter encore 5 ml de pyridine et agiter en refroidissant à 0 °C dans un réacteur hermétique. Ajouter au mélange refroidi 55 g de K_2CO_3 et refermer immédiatement le réacteur. Laisser agir 3-4 heures sous agitation constante et à froid. Décanter la phase aqueuse, laver la phase éthérée avec deux fois 50 ml H_2SO_4 1% puis avec deux portions de 50 ml d'eau. Distiller l'éther, puis sécher sous pression réduite à 50 °C pendant une heure. Recristalliser le dérivé brut de l'éthanol p.a. dilué. Le rendement est de 30 à 50%.

Pour les dérivés des échantillons,les quantités sont adaptées à celle des chlorhydrates à disposition,toutes les autres conditions étant maintenues. La recristallisation finale n' est évidemment pas effectuée avant une analyse en ccm du résidu de l'évaporation à sec.

II. 2. Synthèse des 2,4-dinitroanilines.

Pour les substances de référence , dissoudre 4oo mg du chlorhydrate dans lo à 15 ml d'éthanol en chauffant au besoin (60 ml de solvant sont nécessaires dans le cas de NH_4Cl. A cette solution placée dans un Erlenmeyer rôdé, ajouter 4 ml NaOH 10% et agiter un instant à flacon fermé. Ajouter en solution alcoolique, une quantité de 2,4-dinitrofluorobenzène équimolaire à celle du chlorhydrate et agiter fortement à flacon fermé, puis placer le mélange à reflux pendant 10 minutes. Ajouter de l' eau jusqu' à un léger trouble et laisser cristalliser à température ambiante, puis au frigo. Essorer, laver avec un peu d' alcool dilué et sécher sous 15 mm Hg sur silicagel; la recristallisation peut se faire de l' alcool dilué. Le rendement est de 65-85%.

Pour les dérivés des échantillons, on adaptera les quantités de FDNB à celle du chlorhydrate en considérant, pour le calcul, que ce dernier est du NH_4Cl. On fait évidemment la ccm sans recristalliser le produit brut.

II. 3. Spectres IR des 3,5-dinitrobenzamides.

Fig. 48 a: spectre IR de la 3,5-dinitrobenzamide.

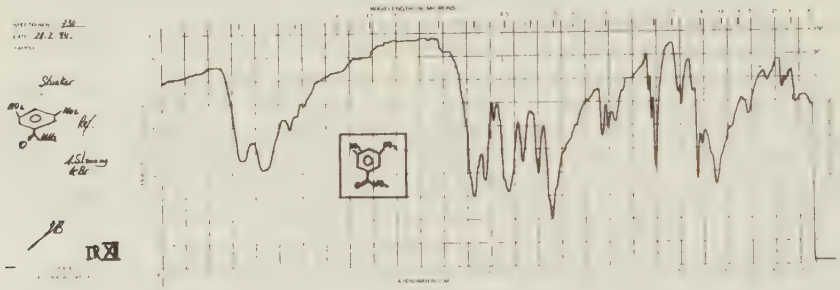


Fig. 48 b: spectre IR de E-DNBA.

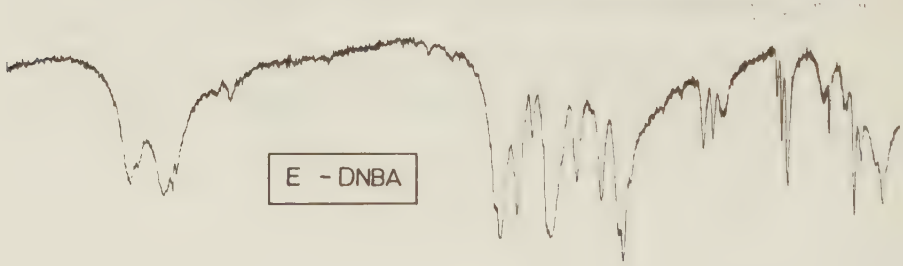


Fig. 48 c: spectre IR de A_{11}-DNBA.

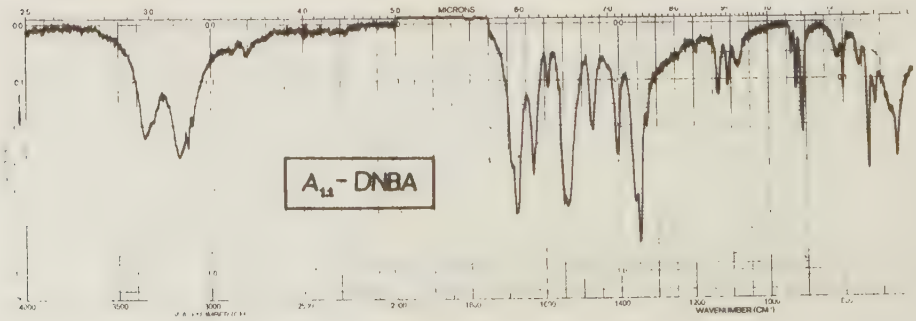


Fig. 48 d: spectre IR de A_{13}-DNBA.

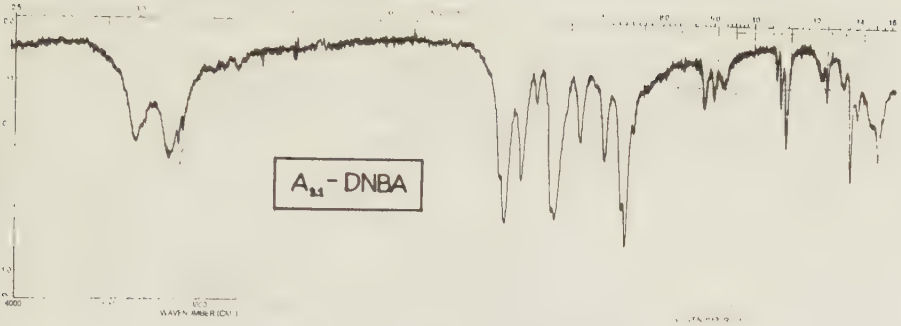


Fig. 48 e: spectre IR de B_{11}-DNBA.

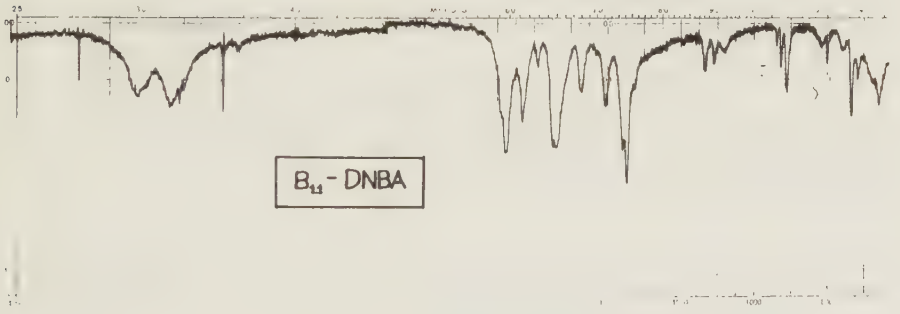
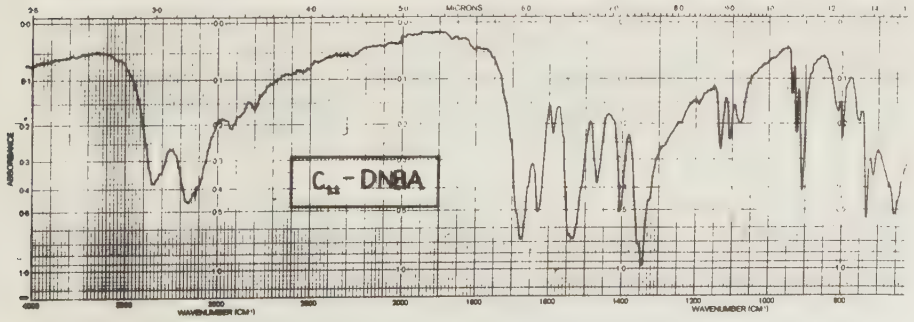


Fig. 48 f: spectre IR de C_{11}-DNBA.



II. 4. Dosage du chlorure dans A_{11} et B_{11}.

On détermine d' abord le pourcentage du chlorure par une triple titration au nitrate d' argent centinormal selon Mohr de solutions environ 0.01-n de nos échantillons. On obtiendra ensuite le rapport NH_4Cl dans ces échantillons en résolvant le système de deux équations à deux inconnues suivant:

$$\begin{cases} 66.28\ x + 37.10\ y = (\text{pourcentage } Cl^- \text{ trouvé}) \cdot 100 \\ x + y = 100 \end{cases}$$

66.28 est le pourcentage de chlorure dans NH_4Cl,

37.10 est le pourcentage de chlorure dans $(CH_3)_3NHCl$,

x est le pourcentage de NH_4Cl dans l' échantillon,

y est le pourcentage de $(CH_3)_3NHCl$ dans l' échantillon.

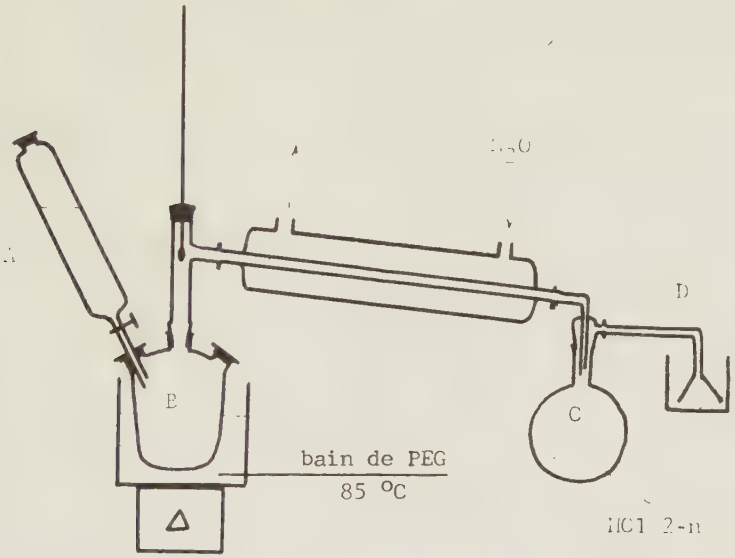
A_{11} contenant 64.24% et B_{11} 64.44% de chlorure, on trouve, en résolvant le système ci-dessus, les valeurs citées dans la partie B, aux pages 23 et 27.

III. FLACON II.

Recherche des amines volatiles dans le flacon II.

Comme déjà mentionné sous III. 1.(p.35), il était intéressant de voir si une certaine proportion d' amines volatiles passait dans le flacon I sans y être absorbée. Pour cela, après essorage du dépôt de PbS, le contenu du flacon II a été alcalinisé par NaOH et distillé dans le montage de la figure 49. Le distillat,reçu sur HCl 2-n, est évaporé à sec et le résidu pesé. Ce poids est ensuite comparé à celui du dépôt obtenu par évaporation à sec de la solution du flacon I. Les résultats sont cités sous III.1. (p.32).

Fig. 49: récupération des amines volatiles du flacon II.



Le contenu du flacon II, placé en A, tombe dans B où il est alcalinisé et distillé. Le distillat est reçu sur HCl dilué dans C. D, tout en empêchant les surpressions, permet d' éviter des pertes d' amines volatiles.

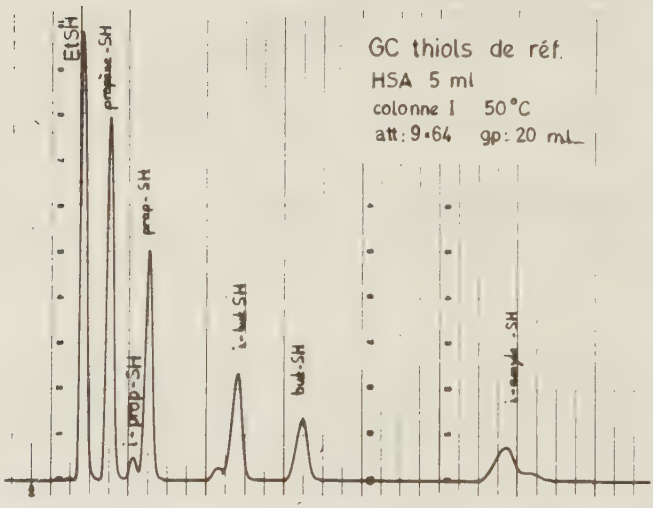
IV. ANALYSE DES THIOLS.

IV. 1. Thiols de référence.

Le méthanethiol utilisé a été obtenu de la maison Flucka sous forme liquide dans un emballage forme "spray".

L' éthanethiol, de même que les thiols supérieurs (C_3-C_5) ont été synthétisés à partir du bromure d' alcoyle correspondant en passant par le bromure d' alcoylisothiuronium (47). Les bromures d' alcoyle qui n' ont pu être trouvés dans le commerce ont été synthétisés à partir de l' alcool correspondant et d' acide bromhydrique. La séparation des thiols par GC avec notre colonne apolaire est excellente (fig. 5o).

Fig. 5o: GC des thiols de référence.

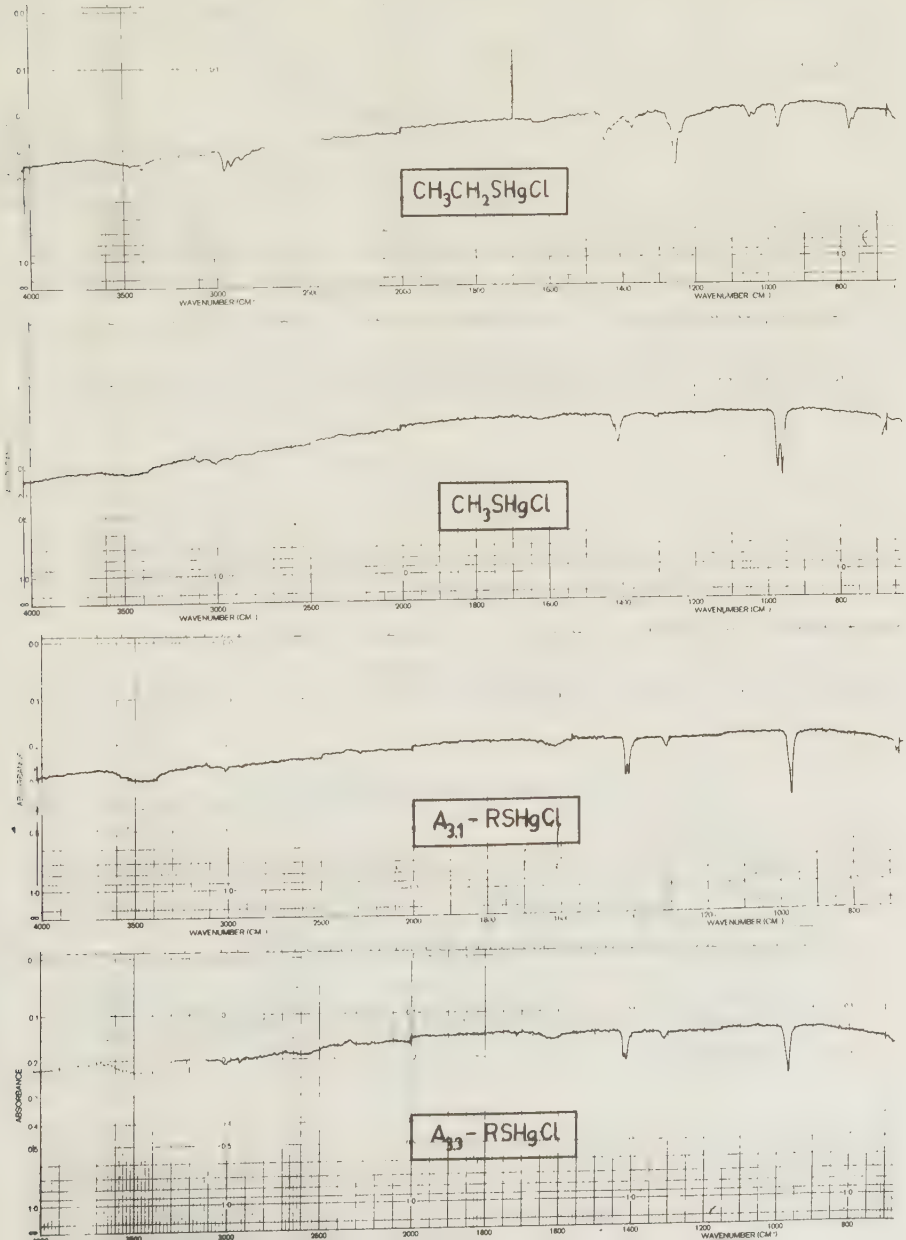


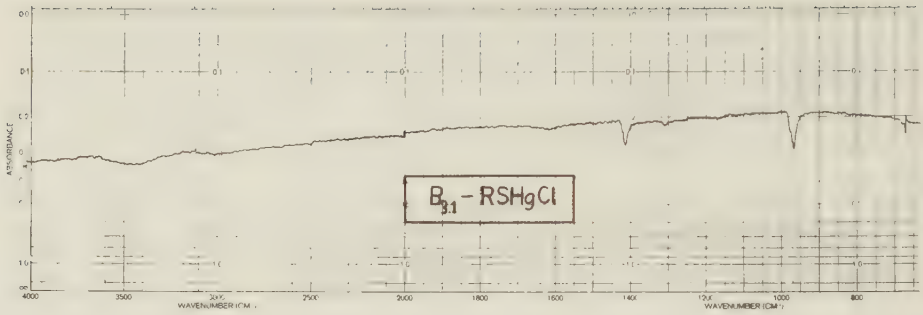
IV. 2. Synthèse de CH_3SHgCl et CH_3CH_2SHgCl.

Le thiol est entraîné par un courant d' azote dans une solution de chlorure mercurique à 5%. Le précipité est essoré, lavé avec H_2O, puis séché sur silicagel sous 15 mm de Hg.

Spectres IR des dérivés mercuriques: malgré le fort bruit de fond, courant avec ce genre de composés, on distingue cer-

tains pics caractéristiques. Preuve en est la différence tout de même nette entre les spectres des dérivés méthyl- et éthyl.





IV. 3. Passage du sel mercurique au dérivé DNPTE.

La décomposition du sel mercurique se fait dans le montage de la figure 52, et le passage au dérivé organique dans celui de la figure 53.

Fig. 52: décomposition du sel mercurique.

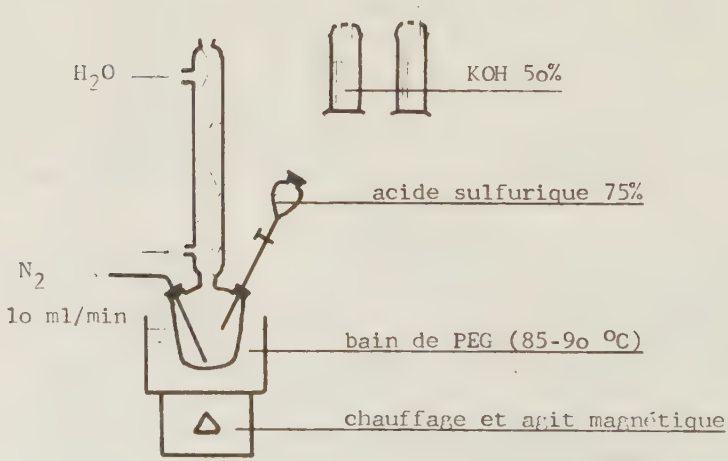
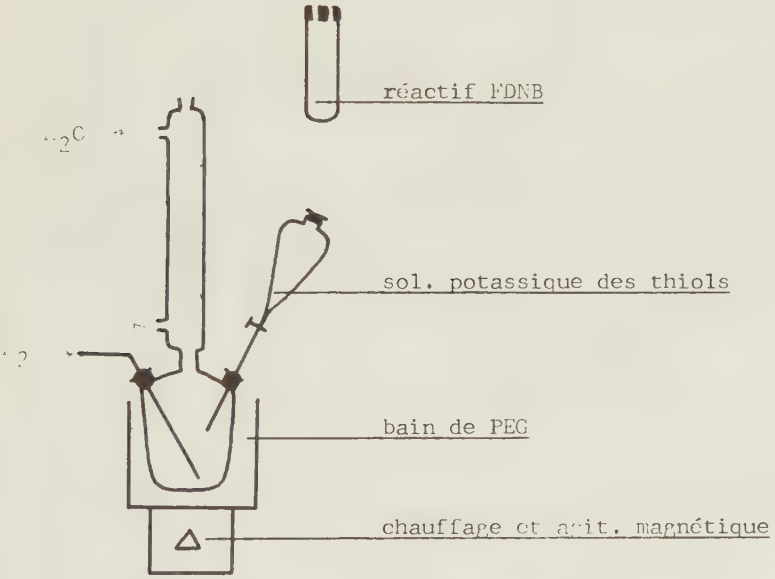


Fig. 53: passage au dérivé DNPTE.



Résumé des décompositions:

sel	H_2SO_4	Temps	Temp.	Résidu non déc.
47o mg A_{31}	75%	218 h	85-9o °C	73.5 mg
4oo mg A_{33}	75%	24o h	85-9o °C	56.o mg
8o mg B_{31}	75%	24o h	85-90 °C	18.o mg

Réactif FDNB: 2oo mg FDNB + lo ml EtOH p.a. + 1 ml Py dist.

On adaptera si possible la quantité de réactif de telle manière à ce qu' il n'y en ait pas en excès, vu les difficultés qu' il crée lors de la cristallisation du dérivé.

Fig. 54 a: spectre IR du Me-DNPTE.

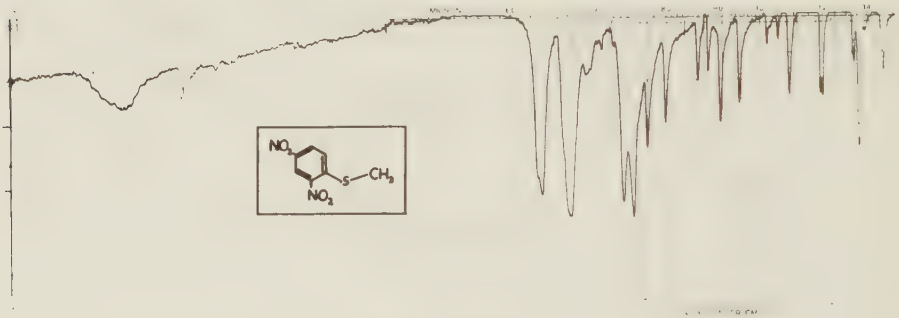
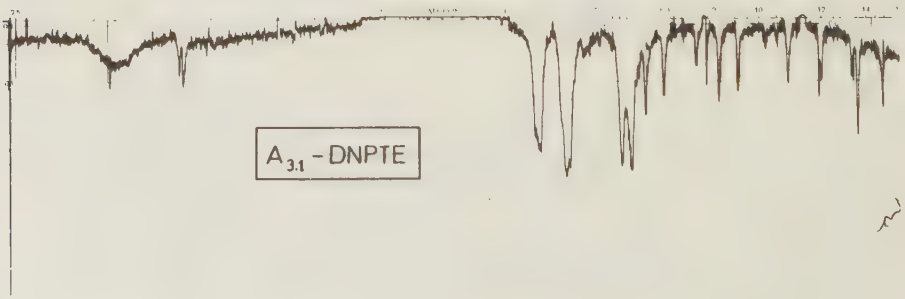


Fig. 54 b: spectre IR de A31-DNPTE.



IV. 4. GC des thiols.

Selon la méthode b), 1 ml de la solution de KOH contenant le(s) thiol(s) est placée dans un flacon Erlenmeyer de 5o ml. On acidifie avec 1o ml d' acide sulfurique à 2o% et agite à flacon fermé. Après quelques minutes, on prélève 5 ml de l' atmosphère du flacon et les injecte directement dans la colonne. La température du four est celle du laboratoire (18-2o °C). Dans la présentation, pour gain de place, les chromatogrammes ont été coupés après que l' on ait constaté l' absence de pics correspondant à des thiols plus lourds (C_3-C_5).

Les essais à blanc ont été faits en mélangeant dans le flacon 1 ml de KOH 5o% et 1o ml de H_2SO_4 2o% et en poursuivant comme ci-dessus.

V. ANALYSE DES SUBSTANCES CARBONYLEES

V. 1. Synthèse des substances témoin.

Ce travail a été nécessaire pour comparer nos résultats avec ceux de Freund. Pour les deux premiers témoins, nous avons utilisé la même méthode que cet auteur.

Phénylacétaldéhyde: 25 g de phénylacétaldéhyde-diméthylacétal ont été hydrolysés par 1oo ml d' acide chlorhydrique 2-n sous reflux pendant 2o min. La phase inférieure a été décantée et la phase aqueuse extraite à l' éther. Les phases organiques réunies ont été séchées sur le sulfate de sodium anhydre pendant 3 jours, puis l' éther distillé. L' aldéhyde est ensuite rectifié sous vide.

α-phénylcrotonaldéhyde (44): un mélange de 6.4 g de phénylacétaldéhyde, 5.36 g d' éthanol absolu, 5.7 g d' eau, 3.47 ml (2.7 g) d' acétaldéhyde et 2,7 g d' acétate de sodium crist. est placé à reflux à 12o °C pendant 24 h. On décante et extrait la phase aqueuse deux fois avec de l' éther "pour narcose". Les phases organiques sont réunies, séchées sur le sulfate de sodium anhydre et l' éther distillé. Le résidu (4.5 ml) est rectifié sous vide. On obtient 4.1 ml d' α-phénylcrotonaldéhyde pur.

Dihydrochalcone (45): 10 g de chalcone (benzalacétophénone) sont dissous dans l'acide acétique glacial. La solution fluorescente est traîtée par de la poudre de zinc, puis chauffée à reflux (130 °C) pendant 4 heures. Par adjonction d'eau, on obtient un précipité blanc-gris que l'on extrait pendant trois jours avec de l'éther. Filtrer et sécher la solution éthérée, distiller le solvant et rectifier finalement la dihydrochalcone sur bain d'air à pression ordinaire.

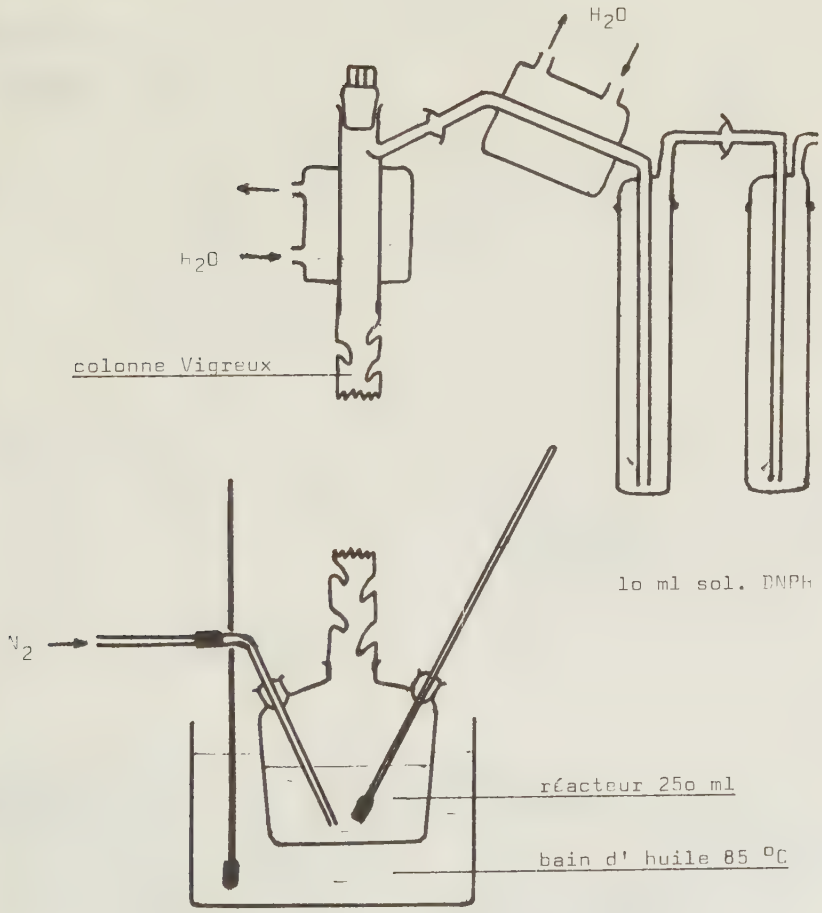
V. 2. Synthèse des 2,4-DNPHones (46)

Chauffer 1 g de 2,4-DNPH avec 2 ml d'acide chlorhydrique concentré et 20 ml d'éthanol jusqu'à obtention d'une solution limpide. Ajouter 0.5 g du composé carbonylé, porter à reflux pendant 5 min et laisser refroidir. Essorer le dérivé formé et le recristalliser de l'éthanol.

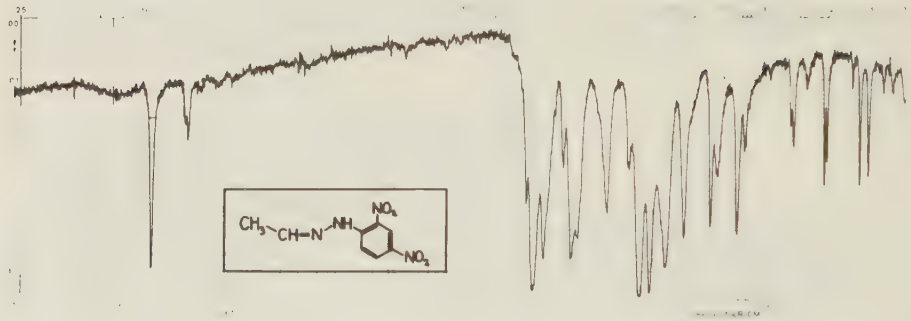
V. 3. Purge du flacon I.

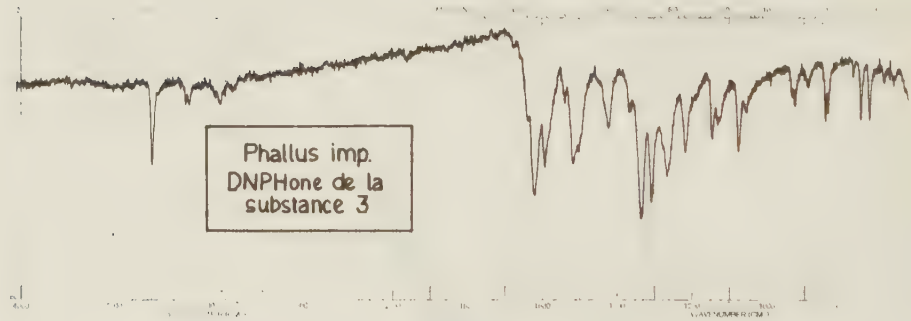
Elle s'effectue dans le montage de la figure 55, à une température de 85 °C et un débit d'azote pur de 1 bulle/seconde (environ 10 ml/min).

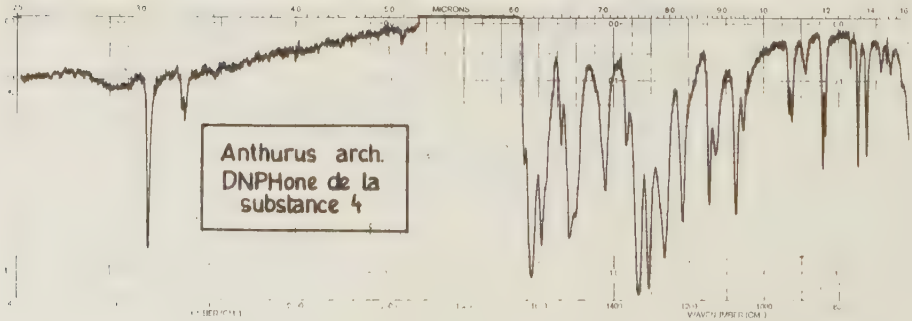
Figure 55: montage pour la purge du flacon I.

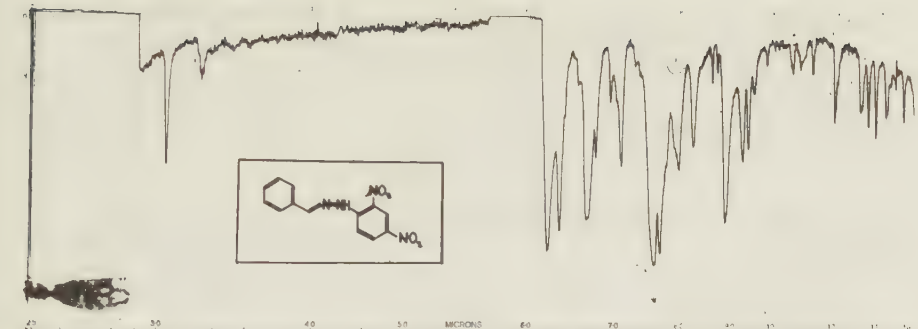


V. 4. Spectres IR des DNPHones.

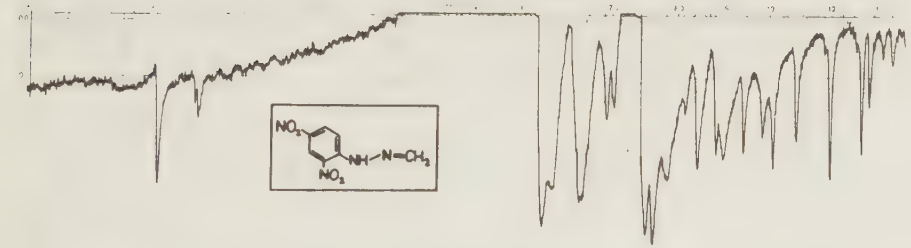








Phallus imp.
DNPHone de la
substance 1



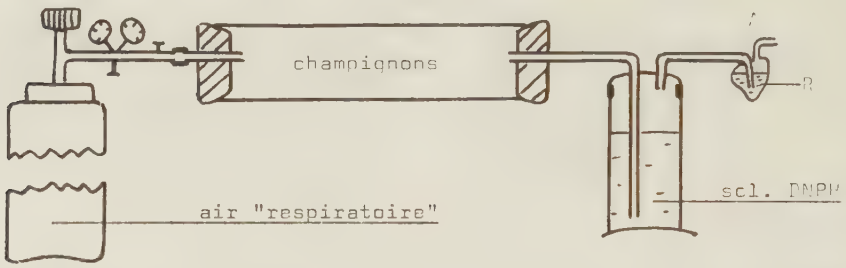
Anthurus arch.
DNPHone de la
substance 5

VI. RECHERCHE D'AUTRES SUBSTANCES.

VI. 1. Acide cyanhydrique.

Essai avec la suspension de AgI (34).
Le schéma de la figure 56 montre le montage utilisé pour cet essai.

Figure 56.



Réactifs: solutions aqueuses de KI 5%, KOH 5% $AgNO_3$ 0.001-n.
Le flacon laveur contenant la DNPH sulfurique sert à piéger les amines et les composés carbonylés, mais ne retient pas HCN.
Le tableau no 4 donne les résultats obtenus avec les chapeaux de divers âges et des quantités croissantes de AgI .

L'âge zéro est celui où le champignon sort de son péridium.
L'essai est positif lorsque l'opalescence a disparu dans A.

Tabl. 4.

chapeaux		composition de R dans A			résultat
nombre	âge (h)	gttes KI	gttes $AgNO_3$	ml KOH	
15	0-24	1	1	1	+
15	24-48	2	2	1	+
15	48-72	3	3	1	±
8	0-48	4	4	1	+
15	0-15	5	5	1	+

Un essai à blanc, effectué sans champignons, avec le même débit d'air (environ 10 ml/min) et R composé de trois gouttes de KI, trois gouttes de $AgNO_3$ et 1 ml de KOH montre que l'opalescence ne disparaît qu'après six jours environ, ceci non par solubilisation du précipité, mais par agglomération de celui-ci en grains plus gros, se collant sur les parois en verre de A.

Essai selon Schönbein (35).

Réactif: mélange de 10 volumes d'une solution de 0.1 g de résine de Guaîac dans 50 ml d'éthanol et de 3 volumes d'une solution fraîche de $CuSO_4$ 1 o/oo.

Essai selon Brunswick (36,37).

Réactif a): solution de $AgNO_3$ 1% colorée avec une solution aqueuse de bleu de méthylène.

Réactif b): diluer 1 ml de solution de $AgNO_3$ 10% avec 4 ml d'une solution aqueuse de bleu de méthylène et ajouter 5 ml de HNO_3 (D=1.4).
Filtrer. Stabilité: 1 mois.

Essai selon Rosenthaler (39).

Après essorage du précipité de RSHgCl, nous avons divisé le filtrat en deux parties.
1ère partie: le Hg ^{II} en excès est précipité par une solution de polysulfure de calcium en léger excès (se reconnaît à la coloration jaune du surnageant). Filtrer et évaporer le filtrat à sec au bain-marie en maintenant toujours la faible coloration jaune par adjonction de petites quantités de polysulfure.

Reprendre le résidu avec 5 ml d'eau, acidifier avec cinq gouttes d'acide sulfurique dilué (→pH 4-5). Après dégagement des gaz, neutraliser l'acide avec du $CaCO_3$ en léger excès, filtrer et laver le résidu à l'eau.

Evaporer le filtrat à sec, reprendre par un peu d'eau, acidifier avec une goutte d'acide sulfurique dilué et ajouter une goutte de solution de sulfate ferrique à 5%. Une coloration rouge persistante indique un résultat positif.
2ème partie: le Hg^{II} est fixé par un excès de KI et le mélange acidifié par l'acide acétique. On distille sur flamme nue en recevant le distillat dans un peu d'eau. Essai à la phénolphtaline: ajouter à 10 ml de ce distillat une goutte de $CuSO_4$ 1 o/oo et ml de solution de phénolphtaline. Une coloration rougeâtre indique un résultat positif.
Essai à la solution iodo-amidonnée: introduire dans les deux éprouvettes une solution iodo-amidonnée légèrement bleue et ajouter à la première de l'eau jusqu'à ce que la solution soit

encore juste bleuâtre. Ajouter alors à la seconde exactement le même volume de distillat. Une décoloration (I_2 + HCN ⟶ ⟶ICN + HI) dans cette seconde éprouvette indique une résultat positif.

VI. 2. Essai d'extraction de l'amygdaline.

Une trentaine d'oeufs de Phallus (1450 g) ont été rapidement incisés, les chapeaux détachés, coupés en morceaux d'environ 1 cm^2 et jetés dans l'alcool. L'extraction s'est poursuivie conformément au schéma de la figure 57.

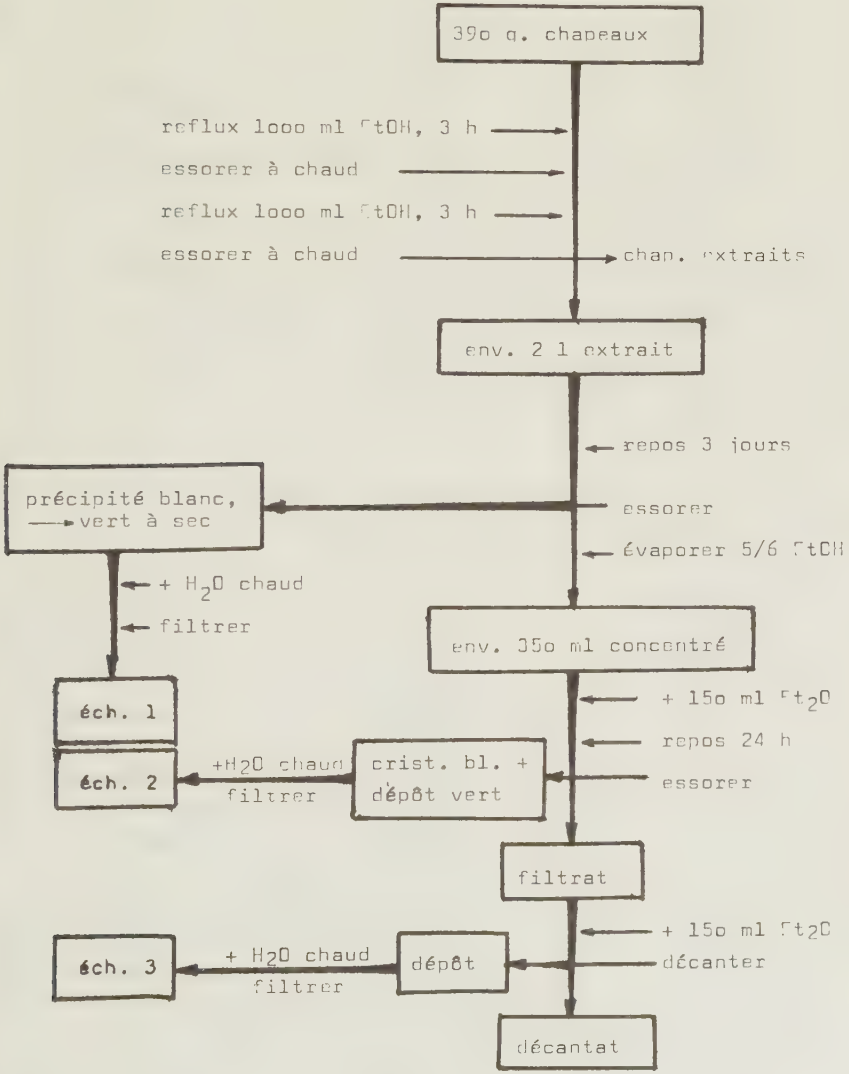
Ccm des échantillons 1-3 (cf figure 42).

1) Phase stationnaire pour 5 plaques de 20 x 20 cm: 30 g GF_{254} + 60 ml de bisulfite de sodium 0.1-m. Epaisseur: 0.25 mm. Phase mobile: 7.

2) Phase stationnaire pour 5 plaques de 20 x 20 cm: 30 g GF_{254} + 60 ml d'acétate de sodium 0.02-m. Epaisseur: 0.25 mm. Phase mobile: 8

Révélation: Elle est nulle en UV et excellente avec un spray de 0.5 ml d'anisaldéhyde + 50 ml d'acide acétique glacial + 1 ml d'acide sulfurique concentré. Placer à l'étuve à 105 - 110 °C jusqu'à la coloration maximale des taches.

Figure 57: schéma d' extraction de l' amygdaloside.



D. BIBLIOGRAPHIE.

1) B. FREUND, thèse Marburg 1967.

2) C. REINHARD, thèse Würzburg 1961.

3) J. GURVICH et B. MILLER, cités par R. PITTET, Tribune de Lausanne 14.10.74.

4) G. KLEIN et M. STEINER, Jb. wissensch. Bot. 68, 602 (1928)

5) M. STEINER et E. STEIN v. KAMIENSKI, Naturwissenschaften 40, 483 (1953)

6) P.H. LIST et C. REINHARD, Arch. Pharmaz. 295, 564 (1962)

7) H. WIEGANDT, Naturwissenschaften 53, 200 (1966)

8) P.H. LIST et B. FREUND, Naturwissenschaften 53, 585 (1966)

9) P.H. LIST et B. FREUND, Naturwissenschaften 54, 368 (1967)

10) P.H. LIST et B. FREUND, Naturwissenschaften 54, 648 (1967)

11) K. EGLE, Planta 38, 233 (1950)

12) P.H. LIST et MANSSEN, Arch. Pharmaz. 292/64, 21 (1959)

13) P.H. LIST et B. FREUND, Planta Med. Suppl. 1968 123-132

14) H. CLEMENÇON, Schw. Zeitschr. f. Pilzk. 50, 4 (1972)

15) E. STAHL, Dünnschichtchromatographie, Springer Verlag Berlin 1967, p. 470

16) Beilstein E II 1, 276

17) B. SEIFERT et M. KOLBE, Fres. Zt. Anal. Chem. 271/5, 337 (1974)

18) E. STAHL, Dünnschichtchromatographie, Springer Verlag Berlin 1967, p. 215

19) Beilstein H 1, 288

20) A. SCHOBERL et A. WAGNER, Houben-Weil, Methoden der Org. Chem. Bd. 9, Thieme Verlag Stuttgart 1955, p. 43

21) PETE KLASON, Ber. 20, 3407 (1887)

23) A. VOGEL, A Text-book of pract. org. Chem. 3rd ed. Longmans, London 1956, p.500

24) H. ZAHN et A. WURZ, Pharm. Z'Halle, 1953, 376

25) B FREUND, Thèse Marburg 1967, 39, 77,

26) EL. S. AMIN, J. Chem. Soc. London 1958, 4769

27) J. SACHS et L. BALASSA, Zeit. anorg. Chem. 146, 196 (1925)

28) R. OTTO, Ber. 13, 1289 (1880)

29) H. RHEINBOLDT, F. MOTT et E. MOTZKUS, J. pr. 134(2), 257 (1932)

30) B. FREUND, thèse Marburg 1967, 38

31) L. ROSENTHALER, Handbuch der Pflanzenanalyse Bd III, Springer Verlag Wien 1933, p. 1045

32) E. RATHAY et B. HAAS, cités par B. FREUND, thèse Marburg 1967

33) G. KLEIN, Handbuch der Pflanzenanalyse Bd IV/2, Springer Verlag Wien 1933, p. 874

34) Beilstein H II, vierte Aufl., 38.

35) T. SUNDBERG, Fres. Zt. Anal. Chem. 61, 112 (1922)

36) H. BRUNSWICK, Sitzungsbericht K. Akad. Wiss. Wien, Math.-Naturwiss. Kl I, 130,383 (1922)

37) MALITZKI et KOSLOWSKI, Mikrochemie 7, 94 (1929)

38) MIRANDE, C.r. Acad. sciences 149, 140 (1929)

39) L. ROSENTHALER, Handbuch der Pflanzenanalyse Bd. III, Springer Verlag Wien 1933, p. 1037

40) E. STAHL, Dünnschichtchromatographie, Springer Verlag Berlin 1967, p. 774

41) O. HILBER, Zeitschrift f. Pilzk. 34, 153 (1968)

42) A. SCHMIDT, Chem. Zentr. 1903, I, 1443

43) H. KALDEWEY, dans Stahl, Dünnschichtchromatographie, Springer Verlag Berlin 1967, p. 449

44) R. KUHN et J. MICHEL, Ber. 71, 1126 (1938)

45) W. SCHNEIDEWIND, Ber. 21, 1325 (1888)

46) A. VOGEL, A Text-book of pract. org. chem. 3 rd. ed. Longmans, London 1956, p. 720.

47) A. VOGEL, A text-book of pract. org. chem. 3 rd. ed. Longmans, London 1956, p. 497

48) W.B. THURNER Fungal metabolites, Academic Press, London and New York, 1971, p. 22